

Vorab per Fax: 39 Seiten - 2. Sendung bei erster Sendung mit einer Seite

PCT**ANTRAG**

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) K 2779 - hu/msl

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG	
Selektion von monoklonalen Antikörpern	
Feld Nr. II ANMELDER	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.) Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 D-69120 Heidelberg DE	<input type="checkbox"/> Diese Person ist gleichzeitig Erfinder Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input checked="" type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.) BREITLING, Frank Bergheimer Str. 123 D-69120 Heidelberg DE	Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.	
Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT	
Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: <input checked="" type="checkbox"/> Anwalt <input type="checkbox"/> gemeinsamer Vertreter	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) HUBER, Bernard Truderinger Str. 246 81825 München	Telefonnr.: 089 / 42724748 Telefaxnr.: 089 / 42724749 Fernschreibnr.:
HUBER & SCHÜSSLER Patentanwälte - Patent Attorneys Truderinger Straße 246 - 81825 München Tel. 089/42 72 47 48 - Fax 089/42 72 47 49	
<input type="checkbox"/> Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und stattdessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.	

Blatt Nr. ...2...

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p>POUSTKA, Annemarie ✓ Werderstr. 36 D-69120 Heidelberg DE</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p>MOLDENHAUER, Gerhard ✓ Brückenstr. 41 D-69120 Heidelberg DE</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p>	

Blatt Nr. 3

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ **AP** ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ **EA** Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP** Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ **OA** OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> IN Indien | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestätigungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Blatt Nr. 4

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH					<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:			
		nationaler Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt	
Zeile (1) 11. Januar 1999 (11.01.99)	199 00 635.0	DE			
Zeile (2)					
Zeile (3)					
<input checked="" type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) <u>1</u> bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist). * Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedsstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.					
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE					
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):		Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):			
ISA / EPA		Datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Staat (oder regionales Amt)	
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE					
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:			
Antrag	: 4	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung			
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil)	: 16	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht			
Ansprüche	: 3	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):			
Zusammenfassung	: 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift			
Zeichnungen	: 15	5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:			
Sequenzprotokollteil der Beschreibung	:	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:			
Blattzahl insgesamt	: 39	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material			
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):		8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form			
		9. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten): Kop.f.Priobel. / Scheck			
		Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: deutsch			
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS					
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.					
München, 11. Januar 2000					
Dr. Bernhard Huber					

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:
--

8. Januar 2000

Unser Zeichen: K 2779 - hu / msl

Selektion von monoklonalen Antikörpern

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern sowie hierfür verwendbare Mittel.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern beruht auf einem von Köhler und Milstein entwickelten Verfahren. Nach diesem Verfahren werden B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert, wodurch Antikörper-produzierende Hybridomzellen erhalten werden. Ein solches Verfahren weist große Nachteile auf. Insbesondere ist es aufwendig Antikörper zu selektionieren, da dies eine getrennte Kultivierung von Hybridomzellen erfordert. Letzteres führt auch dazu, daß nur eine begrenzte Zahl von Hybridomzellen erfaßt und somit auch nicht alle Antikörper selektioniert werden können, was insbesondere nachteilig ist, wenn Antikörper mit höchster Affinität für ein Antigen selektioniert werden sollen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem monoklonale Antikörper hergestellt werden können, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß monoklonale Antikörper auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden können. Er hat erkannt, daß hiermit monoklonale Antikörper selektioniert werden können, ohne daß Hybridomzellen getrennt kultiviert werden müssen. Auch hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern sowohl gegenüber einem bestimmten als auch vielen (un)bestimmten Antigenen einer Antigen-Bibliothek erfolgen kann. Ferner hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern auch hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antige-

8. Januar 2000

2

nen erfolgen kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern bereitzustellen. Ein solches Verfahren umfaßt die Fusionierung von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.

Der Ausdruck "B-Lymphozyten" umfaßt B-Lymphozyten jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorstufen von B-Lymphozyten sein. Ferner können die B-Lymphozyten von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Desweiteren können die B-Lymphozyten von einem gesunden oder kranken Organismus stammen. Günstig ist es, wenn sie von einem immunisierten Organismus stammen. Besonders günstig ist es, wenn die B-Lymphozyten für humane Antikörper oder Teile davon kodieren. Handelt es sich um B-Lymphozyten aus Tieren, ist dies erreichbar, indem die Tiere für die humanen Antikörper bzw. Teile davon transgen sind. Die Herstellung solcher Tiere kann durch übliche Verfahren erfolgen, wobei sich anbietet, die Gene für die humanen Antikörper die Teile davon in embryonale Stammzellen einzuführen, aus denen dann die Tiere generiert werden. Die Bereitstellung von B-Lymphozyten und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Myelomzellen" umfaßt Myelomzellen jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorläufer von Myelomzellen sein. Ferner können die Myelomzellen von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Bevorzugte Myelomzellen sind Abkömmlinge der Maus-Stämme P3K, P3-X63.Ag8, X63.Ag8.653, NSO/1, Sp2/O-Ag14 und FO, der Ratten-Stämme Y3-Ag1.2.3, YB2/0 und IR9834, und der menschlichen Stämme U266, SK007 und Karpas 707. Die Bereitstellung von Myelomzellen und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

8. Januar 2000

3

Der Ausdruck "Antikörper-produzierende Hybridomzellen" umfaßt Zellen, die durch Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen entstehen und Antikörper produzieren. Es wird auf die Ausführungen hinsichtlich B-Lymphozyten und Myelomzellen entsprechend verwiesen. Hybridomzellen können tierische und/oder menschliche Nukleinsäuren bzw. Proteine aufweisen. Die Kultivierung von Hybridomzellen kann durch übliche Verfahren erfolgen. Ferner kann es günstig sein, wenn die Hybridomzellen Rekombinasen, z.B. Rag1 oder Rag2, und/oder Mutasen (über)exprimieren. Solches kann durch Transfektion der Hybridomzellen mit entsprechenden Expressionsvektoren erreicht werden. Der Fachmann kennt solche Expressionsvektoren.

Der Ausdruck "Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen" betrifft jegliches Verfahren, mit dem diese Zellen fusioniert werden können. Günstig ist ein Verfahren, bei dem die Zellen über Polyethylenglykol fusioniert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Bindung der Antikörper an Antigene" betrifft jegliches Verfahren, mit dem die auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen exprimierten Antikörper an Antigene binden können. Die Antigene können an Trägern, z.B. Magnetobeads, gebunden sein. Ferner können sie markiert, z.B. fluoreszenzmarkiert, sein. Als Fluoreszenzmarker bieten sich z.B. FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin an. Desweiteren können die Antigene an Biotin gekoppelt sein. Gebundene Antigene können dann durch übliche Verfahren, z.B. FACS-Analyse, nachgewiesen werden, wodurch auch die entsprechenden Antikörper detektiert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Antikörper-Bindeprotein" umfaßt jegliches Protein, das einen Antikörper binden und an der Zelloberfläche von Hybridomzellen präsentieren kann. Insbesondere kann das Protein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker aufweisen. Beispiele für ein solches Protein sind natürliche Fc-Bindeproteine, wie CD16, CD32 und CD64. Ferner kann das

8. Januar 2000

4

Protein eine Kombination aus einem Signalpeptid, einer Antikörper-Bindestelle und einem Membrananker aufweisen, die in der Natur nicht vorkommt. Eine solche Kombination kann Teile natürlicher Fc-Bindeproteine umfassen. Ferner kann sie als Signalpeptid ein solches einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, als Membrananker eine Transmembran-Domäne von PDGRF oder CD52 und als Antikörper-Bindestelle eine Antigen-Bindungsdomäne eines bakteriellen Proteins, wie Protein A, Protein G, Protein L oder Protein LG, aufweisen. Günstig kann es sein, wenn die Kombination mehrere Signalpeptide, Antikörper-Bindestellen und/oder Membrananker aufweist. Besonders günstig kann es sein, wenn das Antikörper-Bindeprotein, insbesondere die Antikörper-Bindungsdomäne der bakteriellen Proteine Codons aufweist, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind. Der Fachmann weiß, um welche Codons es sich hier handelt.

Bevorzugte Antikörper-Bindeproteine sind in den Figuren 1-3 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 umfaßt das Signalpeptid eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, vier Antikörper-Bindungsdomänen des Proteins L und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1782 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 2 umfaßt das Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern ⁷³⁷~~647~~-1420 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 3 umfaßt das Signalpeptid des Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von PDGFR. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1431 angegeben. Die Antikörper-Bindestellen aller drei Antikörper-Bindeproteine weisen auf DNA-Ebene Codons auf, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind.

Ein Antikörper-Bindeprotein der Figuren 1, 2 bzw. 3 kann eine

8. Januar 2000

5

Aminosäuresequenz aufweisen, die sich durch ein oder mehrere Aminosäuren von der Aminosäuresequenz in den Figuren 1, 2 bzw. 3 unterscheidet. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einzelnen Aminosäuren liegen. Allerdings hybridisiert die DNA dieses Antikörper-Bindeproteins mit der in den Figuren 1, 2 bzw. 3 angegebenen DNA. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, hin. Ferner weist das Antikörper-Bindeprotein mit der veränderten Aminosäuresequenz Gesamt- bzw. Teilfunktionen auf, die mit jenen des Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3 vergleichbar sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein vorstehendes Antikörper-Bindeprotein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine sich durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA" umfaßt jegliche für ein Antikörper-Bindeprotein der Figuren 1, 2 bzw. 3 kodierende DNA, die mit der DNA der Fig. 1, 2 bzw. 3 hybridisiert. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einzelnen Basenpaaren liegen. Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße, für ein Antikörper-Bindeprotein kodierende DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors

8. Januar 2000

6

für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, pCDM8 und pCEV4 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Bevorzugte Expressionsvektoren, die eine erfindungsgemäße DNA enthalten, sind in den Figuren 1-3 angegeben. Es handelt sich um die Expressionsvektoren pSEX11L4, pSEX11G2⁺ und pSEX15G2. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) am 14. Dezember 1998 hinterlegt. Im einzelnen wurde pSEX11L4 unter DSM 12580, pSEX11G2⁺ unter DSM 12581 und pSEX15G2 unter DSM 12582 hinterlegt.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme XL-1 Blue, Top 10 F, HB101, DH5alpha, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, die Hefe-Stämme Saccharomyces cerevisiae und Pichia pastoris, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Myelom- und Hybridomzellen sowie die Insektenzellen sf9.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierter Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter

8. Januar 2000

7

Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Ei der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,
- (b) eine eine erfindungsgemäße DNA exprimierende Zelle,
- (c) ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein,
- (d) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (e) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, Marker, Nachweisreagentien für die Komponenten (a) - (d)

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß von Hybridomzellen produzierte Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen präsentiert werden. Dies erfolgt über ein Antikörper-Bindeprotein. Ein solches kann über die zur Herstellung der Hybridomzellen verwendeten Myelomzellen in die Hybridomzellen eingeführt werden. Ferner kann das Antikörper-Bindeprotein über einen es kodierenden Expressionsvektor in die Hybridomzellen eingeführt werden.

8. Januar 2000

8

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Antikörper zu selektionieren. Dies kann ohne großen Aufwand erfolgen, da Hybridomzellen nicht getrennt kultiviert werden müssen. Vielmehr können komplexe Gemische von Hybridomzellen unmittelbar zur Selektion von Antikörpern verwendet werden. Ferner können Antikörper hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen selektioniert werden. Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung Antikörper von Hybridomzell-Bibliotheken nicht nur gegenüber einem bestimmten Antigen, sondern auch gegenüber vielen (un)bestimmten Antigenen von Antigen-Bibliotheken zu selektionieren.

Somit liefert die vorliegende Erfindung ein Mittel, mit dem u.a. die großen Zeit- und Kosten-Probleme vermieden werden können, die bei der Selektion von monoklonalen Antikörpern bisher auftraten.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11L4 (Fig. 1(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 1(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Fig. 2 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11G2' (Fig. 2(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 2(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Fig. 3 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX15G2 (Fig. 3(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 3(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

8. Januar 2000

9

Beispiel 1: Herstellung von Myelomzellen, die ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

(A) Transiente Expression

Es werden Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 verwendet. Diese Zellen (10^7) werden mit 20-40 μg des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2* (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 500 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in RPMI-Medium, das 10 % FCS enthält, bei 37°C und 5-7,5 % CO_2 inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0.1 % Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0.1 % Na-Azid plus 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ziege anti-Kalb Antikörper (FITC markiert; GAB-FITC, Dianova) inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0.1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0.1 % Na-Azid + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Myelomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen, die durch die transiente Expression eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche der Myelomzellen bedingt ist.

(B) Stabile Expression

Die unter (A) erhaltenen Myelomzellen werden einer 14-24 täglichen G418-Selektion unterzogen, bevor sie, wie unter (A) beschrieben, mit GAB-FITC inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Myelomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 erhalten, die stabil ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche expri-

8. Januar 2000

10

miert.

Beispiel 2: Herstellung von Hybridomzellen, die auf ihrer Zelloberfläche Antikörper mittels eines Antikörper-Bindeproteins exprimieren.

(A)

Es werden 10 Balb/c-Mäuse subkutan mit je 100 µg abgetöteten *Helicobacter pylori* Bakterien in komplettem Freund'schen Adjuvans, das abgetötete *Mycobacter tuberculosis* Bakterien enthält, immunisiert. Nach 4 bzw. 7 Wochen erfolgt jeweils eine intraperitoneale Booster-Injektion mit 100µg abgetöteter *Helicobacter pylori*-/*Mycobacter tuberculosis*-Bakterien. Den Mäusen werden vor jeder Immunisierung bzw. nach der letzten Immunisierung jeweils 100 µl Blutserum entnommen und im Westernblot wird die Antigenspezifische Immunantwort der Maus überprüft. Als Antigen wird ein Aufschluß von bakteriellem Gesamtprotein von *Helicobacter pylori* bzw. *Mycobacter tuberculosis* verwendet. Der Nachweis gebundener Maus-Antikörper wird durch einen Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörper (Dianova) geführt. Mäusen mit einer deutlichen Antigen-spezifischen Immunantwort wird die Milz entnommen und die Lymphozyten werden mit Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 von Beispiel 1 (B) fusioniert. Die Fusion erfolgt durch Polyethylenglykol (vgl. Goding, J.W., Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3. Auflage, (1996), Verlag Accademic Press Limited, 24-28). Es werden Hybridomzellen erhalten. Diese werden 10-12 Tage in HAT-Medium bei 37°C inkubiert. Es wird die Hybridomzell-Bibliothek 2A erhalten.

Es werden Hexapeptide mit N-terminalem Biotin synthetisiert. Die Peptide entsprechen den 6C-terminalen Aminosäuren von 101 bzw. 118 Genprodukten von *Helicobacter pylori* bzw. *Mycobacter tuberculosis*. Ferner werden 10³ Zellen der Hybridomzell-Bibliothek 2A mit kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10µg/ml der vorstehenden Biotin-markierten Peptide inkubiert. Die Zellen werden mit

8. Januar 2000

11

kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1 % Na-Azid + 1 µg/ml Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-Helicobacter pylori- bzw. Mycobacter tuberculosis-Aktivität aufweisen.

(B)

Es werden Zellen der Hybridomzelllinie U98/6, die einen Maus-anti-Urokinase-Antikörper produzieren, verwendet. Diese Zellen (10^7) werden mit 20-40 µg des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2* (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 400 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in inkomplettem AIM V-Medium bei 37°C und 5-7,5 % CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0.1 % Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0.1 % Na-Azid + 10 µg/ml Urokinase-Biotin inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0.1 % Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0.1 % Na-Azid + 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-Urokinase-Aktivität aufweisen.

Die erhaltenen Hybridomzellen werden einer 14-24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie erneut, wie vorstehend be-

8. Januar 2000

12

schrieben mit Urokinase-Biotin und Streptavidin-FICS inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Hybridomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Hybridomzelllinie U98/6.3.3 erhalten, die stabil Antikörper auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

Beispiel 3: Selektion von monoklonalen Antikörpern, die mittels eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen exprimiert werden.

10^3 Zellen der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2 (B) werden mit 10^7 Zellen der Hybridomzelllinie DOB.L1.3 gemischt. Letztere Hybridomzelllinie produziert einen den C-Terminus der humanen HLA-DO- β -Kette erkennenden Antikörper. Dieser wird mittels des gleichen Antikörper-Bindeproteins wie in der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2 (B) auf der Zelloberfläche exprimiert. Das Zellgemisch wird mit kaltem DPBS + 0,1 % Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10 μ g/ml Urokinase-Biotin inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1 % Na-Azid wird das Zellgemisch in DPBS + 0,1 % Na-Azid + 10 μ g/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht in einen FACS-Sorter gegeben.

Es werden Hybridomzellen mit grüner Fluoreszenz selektioniert. In weiterführenden Untersuchungen zeigen diese eine anti-Urokinase-Aktivität. Es werden die Hybridomzelllinien U98/6.3.3 S1-S50 erhalten.

Beispiel 4: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Antikörper-Bindeproteins

(A)

Die DNA von Fig. 1 zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1782 wird mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und

8. Januar 2000

13

in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/Antikörper-Bindeprotein erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/Antikörper-Bindeprotein wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

(B)

10⁶ Zellen der in Beispiel 1 (B) erhaltenen Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 werden mit PBS gewaschen, in PBS + 1 % Tween 20 aufgenommen und auf Eis inkubiert. Partikuläre Zellbestandteile werden durch Zentrifugation bei 30.000g abgetrennt und der Überstand wird auf eine IgG Sepharose Säule (IgG Sepharose 6 Fast Flow Lab Pack von Pharmacia) gegeben. Ungebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt und das erfindungsgemäße Antikörper-Bindeprotein wird in saurem pH eluiert.

Nach seiner Neutralisierung wird das Antikörper-Bindeprotein

8. Januar 2000

14

einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. vorstehend).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 5: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 wird einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 41 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J.

8. Januar 2000

15

Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

8. Januar 2000

16

Pro Immunisierung werden 12 μ g gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans;
icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet.
Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

8. Januar 2000

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker umfaßt.
10
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Fc-Bindeprotein oder Teile davon umfaßt.
15
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus Fc-Bindeproteinen oder Teilen davon umfaßt.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Fc-Bindeprotein CD16, CD32 oder CD64 ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 - 5, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Antikörper-Bindungsdomäne der Proteine A, G, L oder LG umfaßt.
25
7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.
30
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Antikörper-Bindeprotein jenes von Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 ist.
35

8. Januar 2000

18

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die Hybridomzellen Rag1 und/oder Rag2 (über)exprimieren.
- 5 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, wobei die Antigene von einer Antigen-Bibliothek stammen.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene an einen Träger gebunden sind.
- 10 12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Träger Magnetobeads umfaßt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene eine Fluoreszenz- oder Biotinmarkierung umfassen.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Fluoreszenzmarkierung FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin umfaßt.
- 20 15. Antikörper-Bindeprotein, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.
- 25 16. Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15, wobei das Antikörper-Bindeprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1, Fig. 2 bzw. Fig. 3 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.
- 30 17. DNA, kodierend für das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 16, umfassend:
- 35 (a) die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten Code

8. Januar 2000

19

verwandte DNA.

18. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch
17.

5

19. Zellen, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch
18.

10

20. Antikörper, gerichtet gegen das Antikörper-Bindeprotein
nach Anspruch 15 oder 16.

8. Januar 2000

20

Zusammenfassung

5

Selektion von monoklonalen Antikörpern

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene. Ferner betrifft die Erfindung hierfür verwendbare Mittel.

1/18

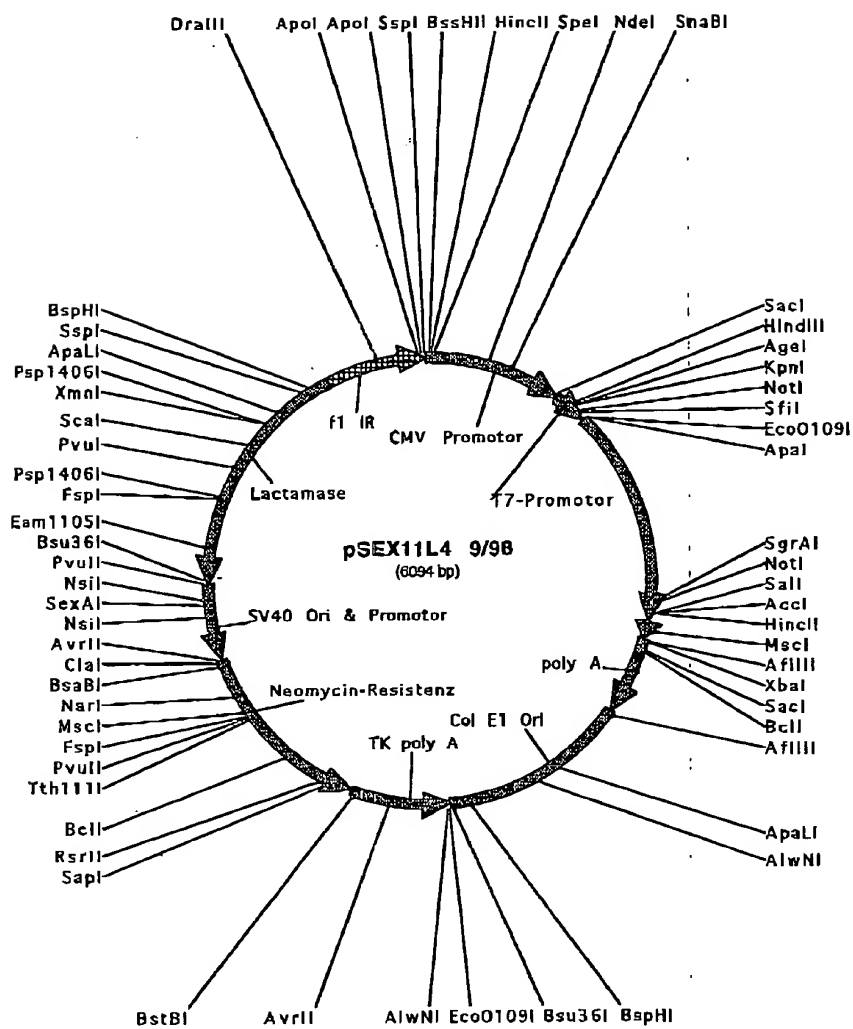


Fig. 1

1/18

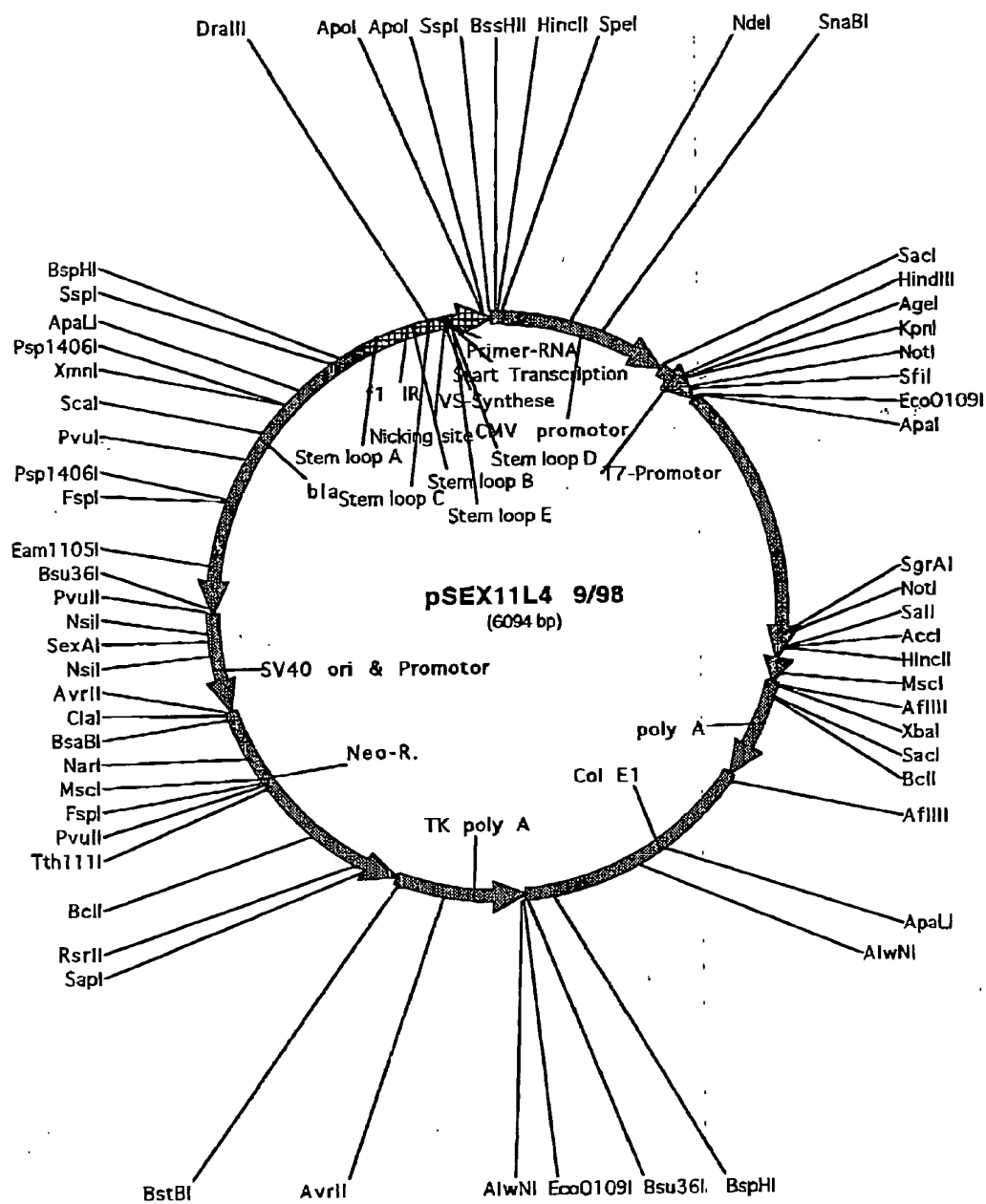


Fig. 1

2/18

BssHII HincII SpeI
 1 CGCGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA
 60 GTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGG
 119 CTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA
 178 CGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCAC
 NdeI
 237 TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG
 CMV promotor
 296 TAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
 SnaBI
 355 AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATC
 414 AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGT
 473 CAATGGGAGTTTGTGTTGGCACAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAAC
 SacI
 532 CCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGA
 T7-Promotor
 591 GCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCA
 Agel
 650 CTATAGGGAGACCAAGCTTGGTACCGGTGCGATGGCACCCCTGCATGCTGCTCCTGCTG
 1 MetAlaProCysMetLeuLeuLeuLeu
 SfiI NotI Apal EcoO109I
 709 TTGGCGGCGCCCTGGCCCCGACTCAGACCCGCGGGGGCCCAAAGGAGAAGACCCC
 109 LeuAlaAlaLeuAlaProThrGlnThrArgAlaGlyAlaGlnLysGluLysThrPro
 768 CGAGGAGCCCAAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCCGACGGCAAGA
 299 oGluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysT
 827 CCCAGACCGCGAGTTCAGGGCACCTTCGAGGAGGCCACCGCGGAGGCTACCGCTAC
 499 hrGlnThrAlaGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyr
 886 GCCGACGCCCTGAAGAAGGACAACGGCGAGTACACCGTGGACGTGGCCGACAAGGCTA
 699 AlaAspAlaLeuLysLysAspAsnGlyGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTy
 945 CACCTGAACATCAAGTTCGCCGGCAAGGAGAAGACCCCGAGGAGCCCAAGGAGGAGG
 889 rThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGluLysThrProGluGluProLysGluGluVal
 1004 TGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCCGACGGCAAGACCCAGACCGCCGAGTTCAAG
 1089 alThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPheLys
 1063 GGCACCTTCGAGGAGGCCACCGCGGAGGCTACCGCTACGCCGACGCCCTGAAGAAGGA
 1289 GlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAs
 1122 CAACGGCGAGTACACCGTGGACGTGGCGACAAGGGCTACACCTGAACATCAAGTTCG
 1479 AsnGlyGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheA
 1181 CCGGCAAGGAGAAGACCCCGAGGAGCCCAAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTG
 1679 laGlyLysGluLysThrProGluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeu
 1240 ATCTACGCCGACGGCAAGACCCAGACCGCGAGTTCAAGGGCACCTTCGAGGAGGCCAC
 1879 IleTyrAlaAspGlyLysThrGlnThrAlaGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaTh
 1299 CGCGGAGGCTACCGCTACGCCGACGCCCTGAAGAAGGACAACGGCGAGTACACCGTGG
 2069 rAlaGluAlaTyrArgTyrAlaAspAlaLeuLysLysAspAsnGlyGluTyrThrValA
 1358 ACGTGGCCGACAAGGGCTACACCTGAACATCAAGTTCGCCGGCAAGGAGAAGACCCCC
 2269 spValAlaAspLysGlyTyrThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyLysGluLysThrPro

Fig. 1 (Forts. 1)

3/18

1417 GAGGAGCCCAAGGAGGAGGTGACCATCAAGGCCAACCTGATCTACGCCGACGGCAAGAC
246▶ GluGluProLysGluGluValThrIleLysAlaAsnLeuIleTyrAlaAspGlyLysTh
1476 CCAGACCGCCGAGTTCAAGGGCACCTTCGAGGAGGCCACCGCGGAGGCTACCGCTACG
265▶ rGlnThrAlaGluPheLysGlyThrPheGluGluAlaThrAlaGluAlaTyrArgTyrA
1535 CCGACGCCCTGAAGAAGGACAACGGCGAGTACACCGTGGACGTGGCCGACAAGGGCTAC
285▶ laAspAlaLeuLysLysAspAsnGlyGluTyrThrValAspValAlaAspLysGlyTyr
SgrAI NotI
1594 ACCCTGAACATCAAGTTCGCCGGCGGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAAGAGGA
305▶ ThrLeuAsnIleLysPheAlaGlyAlaAlaAlaGluGlnLysLeuIleSerGluGluAs
Sall
HincII
AclI
1653 TCTGAATGGGGCCGTCGACGGACAAAACGACACCAGCCAAACAGCAGCCCTCAGCAT
324▶ pLeuAsnGlyAlaValAspGlyGlnAsnAspThrSerGlnThrSerSerProSerAlaS
MscI
1712 CCAGCAACATAAGCGGAGGCATTTTCCTTTCTTCGTGGCCCAATGCCATAATCCACCTC
344▶ erSerAsnIleSerGlyGlyIlePheLeuPhePheValAlaAsnAlaIleIleHisLeu
AflIII XbaI SacI
1771 TTCTGCTTCAGTTGAGGTGACACGTCTAGAGCTATTCTATAGTGTCACCTAAATGCTAG
364▶ PheCysPheSer ***
BclI
1830 AGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTT
poly A
1889 CCCCCGTGCCTTCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAT
1948 GAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGG
2007 GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGG
2066 GCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGTGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC
AflIII
2125 AGGGGATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTA
2184 AAAAGGCCGCTTGTGCGCTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAA
2243 AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTT
2302 TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCGTTACCGGATACC
2361 TGTCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTAT
ApaLI
2420 CTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCA
Col E1
2479 GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG
AlwNI
2538 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
2597 GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
2656 TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT
2715 CCGGCAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACG
2774 CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCA

Fig. 1 (Forts. 2)

4/18

2833 GTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
 2892 CCTAGATCCTTTTAAATTAATAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGGTAA
 Eco0109I
 Bsu36I AlwNI
 2951 CCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTCACC
 3010 CGAAGCTTGGGGGTGGGGTGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCAATGGG
 3069 GTCTCGGTGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCGCGTTTATGAACA
 TK poly A
 3128 AACGACCAACACCGTGCCTTTTATTCTGTCTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGTTC
 AvrII
 3187 TTCCGGTATTGTCTCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACT
 3246 CCAGCATGAGATCCCCGGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCGGGAAACGATTCCG
 3305 AAGCCCAACCTTTCATAGAAGCGGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGCGAGTTGGG
 BstBI
 3364 CGTCGCTTGGTCGGTCATTTGAAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
 2634 ***PhePheGluAspLeuLeu
 3423 GCGATAGAAGCGGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGC
 2564 ArgTyrPheAlaIleArgGlnSerAspProAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheAr
 SapI
 3482 GGTGAGCCCATTCGCCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCACGCTATGTCC
 2364 gAspAlaTrpGluGlyGlyLeuGluGluAlaIleAspArgThrAlaLeuAlaIleAspG
 RsrII
 3541 TGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATT
 2164 InTyrArgAspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySerPheArgGlyAsn
 3600 TTCCACCATGATATTCCGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGT
 1974 GluValMetIleAsnProLeuCysAlaAspGlyHisThrValValLeuAspGluGlyAs
 3659 CGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCCGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCT
 1774 pProMetSerAlaLysLeuArgAlaPheLeuGluAlaProAlaLeuGlyGlnHisGluG
 BclI
 3718 TGATCATCTGATCGACAAGACCGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATG
 1574 InAspAspGlnAspValLeuGlyAlaGluMetArgThrArgAlaArgGluIleArgHis
 3777 TTTCGCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGACGCCCGCCATTG
 1384 LysAlaGlnHisAspPheProCysThrAlaProAspLeuThrHisLeuArgArgMetAl
 3836 CATCAGCCATGATGGTACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGC
 1184 aAspAlaMetIleSerValLysGluAlaProAlaLeuHisSerSerLeuLeuAspGlnG
 Thr111I Pvull
 3895 CCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTGAGCAC
 984 IyProValGluGlyLeuLeuLeuTrpAspArgGlyAlaGluThrValValAspLeuVal
 Neo-R.
 FspI MscI
 3954 AGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCAGATAGCCGCGCTGCTCGTCTTGCA
 794 AlaAlaCysProValGlyThrThrAlaLeuTrpSerLeuArgAlaAlaGluAspGlnLe
 NarI
 4013 GTTCATTAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCT
 594 uGluAsnLeuAlaGlySerLeuAspThrLysValPheLeuValProArgGlyGlnAlaS
 4072 GACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCC
 394 erLeuArgPheValAlaAlaAspSerCysGlyIleThrGlnGlnAlaTrpAspTyrGly
 4131 GAATAGCCTCTCCACCAAGCGCCGAGAACCTGCGTCAATCCATCTTGTTCATCA
 204 PheLeuArgGluValTrpAlaAlaProSerGlyAlaHisLeuGlyAspGlnGluIleMe
 BsaBI ClaI AvrII
 4190 TGGGAAACGATCCTCATCTCTTGTGATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAA
 04t
 4249 AAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGCGGAGGAGGCGGCTCGGCCTCTG
 4308 CATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAAGTGGGCGGAGTT

Fig. 1 (Forts. 3)

5/18

SV40 ori & Promotor NsiI
 4367 AGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAT

SexAI
 4426 GCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACT

NsiI
 4485 AATTGAGATGCATGCTTTCATACCTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACAC

PvuII Bsu36I
 4544 CCTAACTGACACACATTCCACAGCTGGTTCTTCCGCTCAGGACTCTTCCTTTTCA

2874 •••TrpHisLysIleLeu
 Eam110SI
 4662 GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTCGTTTCATCCATAGTTGCGTGACTCCCC
 2814uSerAlaGlyIleGluAlaIleGlnArgAsnArgGluAspMetThrAlaGlnSerGlyT
 4721 GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGAT
 2614hrThrTyrIleValValIleArgSerProLysGlyAspProGlyLeuAlaAlaIleIle
 4780 ACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGGCAGCCGGAA
 2424GlyArgSerGlyArgGluGlyAlaGlySerLysAspAlaIlePheTrpGlyAlaProLe
 4839 GGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGT
 2224uAlaSerArgLeuLeuProGlyAlaValLysAspAlaGluMetTrpAspIleLeuGlnG
 FspI Psp1406I
 4898 TGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCAT
 2024InArgSerAlaLeuThrLeuLeuGluGlyThrLeuLeuLysArgLeuThrThrAlaMet
 4957 TGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTT
 1834AlaValProMetThrThrAspArgGluAspAsnProIleAlaGluAsnLeuGluProGlu
 5016 CCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCC
 1634uTrpArgAspLeuArgThrValHisAspGlyMetAsnHisLeuPheAlaThrLeuGluL
 PvuI
 5075 TTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTAT
 1434ysProGlyGlyIleThrThrLeuLeuLeuAsnAlaAlaThrAsnAspSerMetThrIle
 bla
 5134 GGCAGCACTGCATAATTCTTCTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTCTGTGACTG
 1244AlaAlaSerCysLeuGluArgValThrMetGlyAspThrLeuHisLysGluThrValPr
 Scal
 5193 GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGC
 1044uSerTyrGluValLeuAspAsnGlnSerTyrHisIleArgArgGlyLeuGlnGluGlnG
 5252 CCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTAAAAGTGCTCATCAT
 844IyAlaAspIleArgSerLeuValAlaGlyCysLeuLeuValLysPheThrSerMetMet
 Psp1406I
 5311 TGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTT
 654ProPheArgGluGluProArgPheSerGluLeuIleLysGlySerAsnLeuAspLeuGlu
 ApaLI
 5370 CGATGTAACCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTT
 4544uIleTyrGlyValArgAlaGlyLeuGlnAspGluAlaAspLysValLysValLeuThrG
 5429 TCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACG
 2544uProHisAlaPheValProLeuCysPheAlaAlaPhePheProIleLeuAlaValArg
 SspI
 5488 GAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGT
 64PheHisGlnIleSerMet
 BspHI
 5547 ATTGTCTCATGAGCGGATACATAFTTGATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGT
 5606 CCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGAGCGGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC

Stem loop A
 5665 GGGGGGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCG

Fig. 1 (Forts. 4)

6/18

5724 CTCCTTCGCTTCTTCCTTCCTTTCTGCCACGTTGCCGGCTTCCCCGTCAAGCT
—

5783 CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAA
—
f1 IR Stem loop B

5842 AAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTC,
—
Dralll Stem loop C Primer-RNA

5901 GCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACA
—
Start Transcription
VS-Synthese Nicking site Stem loop D Stem loop E

5960 ACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCITTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGC,
—

6019 CTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTTTAACAAAATAT
—
ApoI ApoI SspI

6078 TAACGCTTACAATTTAC
—

Fig. 1 (Forts. 5)

7/18

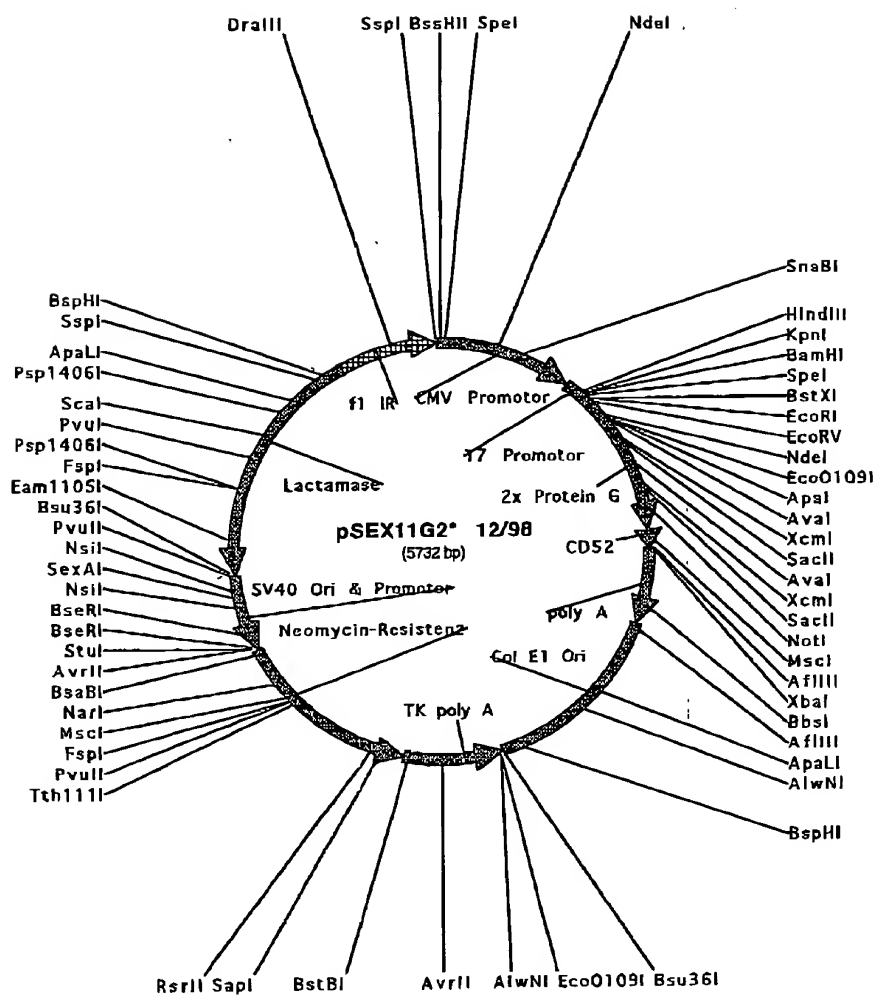


Fig. 2

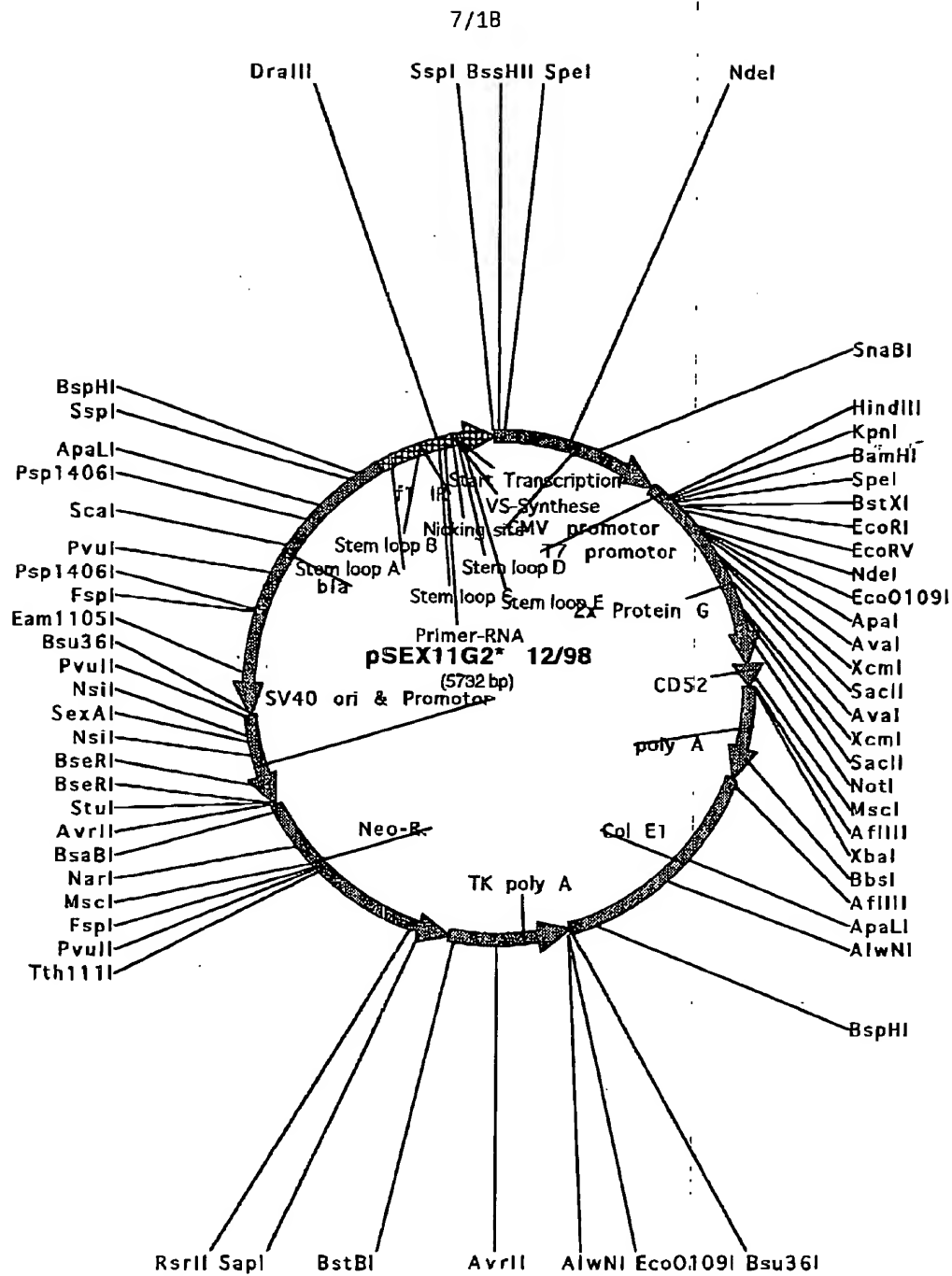


Fig. 2

8/18

BssHII SpeI
 1 GCGCGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT
 55 CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG
 109 GCGCGCTGGCTGACGCGCAACGACCGCGCCATTGACGTCAATAATGACGT
 163 ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGTGGACT
 NdeI
 217 ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTA
 CMV promotor
 271 CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGT
 SnaBI
 325 ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCG
 379 CTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT
 433 TTGACTCAGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
 487 TTTGGCACAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCAT
 541 TGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTC
 T7 promotor
 595 TCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTC
 HindIII KpnI BamHI SpeI BstXI
 649 ACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGC
 EcoRI EcoRV
 703 CAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGGGATATCCACCATGGAGACAGACACTCCT
 1 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu
 NdeI
 757 GCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGGTTCCACTGGTGACTATCCATATGA
 79 uLeu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Pro Tyr As
 ApaI
 EcoO109I Aval
 811 TGTTCAGATTATGCTGGGGCCAAAAGCCCGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCT
 25 pVal Pro Asp Tyr Ala Glu Ala Glu nLys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu
 865 GACCCCGCCGTGACCACCTACAAGCTAGTGATCAACGGCAAGACCTGAAGGG
 43 uThr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gl
 XcmI SacII
 919 CGAGACCACACCGAGGCGGTGGACGCGCCACCGCGGAGAAGGTGTTCAAACA
 61 y Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gl
 973 ATACGCTAATGACAACGGGGTCGACGGCGAGTGGAATTACGACGACGCCACCAA
 79 nTyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Glu Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys
 Aval
 2x Protein G
 1027 GACCTTACCGTGACCGAGAAGCCCGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCTGACCCC
 97 sThr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pr

Fig. 2 (Forts. 1)

9/18

1081 CGCCGTGACCACCTACAAGCTAGTGATCAACGGCAAGACCCTGAAGGGCGAGAC
 115 ▶ aAlaValThrThrTyrLysLeuVallleAsnGlyLysThrLeuLysGlyGluTh

XcmI SacII
 1135 CACCACCGAGGCCGTGGACGCCGCCACCGCGGAGAAGGTGTTCAAACAATACGC
 133 ▶ rThrThrGluAlaValAspAlaAlaThrAlaGluLysValPheLysGlnTyrAl
 1189 TAATGACAACGGGTCGACGGCGAGTGGACTTACGACGACGCCACCAAGACCTT
 151 ▶ aAsnAspAsnGlyValAspGlyGluTrpThrTyrAspAspAlaThrLysThrPh

NotI
 1243 CACCGTGACCGAGGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAA
 169 ▶ eThrValThrGluAlaAlaAlaGluGlnLysLeulleSerGluGluAspLeuAs

1297 TGGGGCGTCGACGGACAAAACGACACCAACCAACGACGCCCCCTCAGCATC
 187 ▶ nGlyAlaValAspGlyGlnAsnAspThrSerGlnThrSerSerProSerAlaSe

CD52 MscI
 1351 CAGCAACATAAGCGGAGGCATTTTCCTTTCTTCGTGGCCAATGCCATAATCCA
 205 ▶ rSerAsnilleSerGlyGlyllePheLeuPhePheValAlaAsnAlallelleHl

AfIIIIXbaI
 1405 CCTCTTCTGCTTCAGTTGAGGTGACACGTCTAGAGCTATTCTATAGTGTCACCT
 223 ▶ sLeuPheCysPheSer ***

1459 AAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC

1513 TGTTGTTTCCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCAC

poly A
 1567 TGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA

BbsI
 1621 TTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
 1675 CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAG

AfIII
 1729 AACCACTGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA
 1783 ACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGC

1837 TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCT

1891 CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGEGTTTCCCC

1945 CTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACC

1999 TGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTA

ApaLI
 2053 GGTATCTCAGTTCGGTGAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC

Col E1
 2107 CCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA

AlwNI
 2161 ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA
 2215 GCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT

2269 ACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTA

2323 CCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCAACCGCTGGTA

Fig. 2 (Forts. 2)

10/18

2377 GCGGTGGTTTTTTTGTTCGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
 2431 AAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACT
 2485 CACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCC
 2539 TTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAACCTG
 2593 AGGCTATGGCAGGGCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTCA
 2647 CCGAACTTGGGGGTGGGGTGGGAAAAGGAAACGCGGGCGTATTGGCCCC
 2701 AATGGGCTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGC
 2755 GTTATGAACAAACGACCAACACCGTGCCTTTATTCTGTCTTTTATTGCGG
 2809 TCATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCC
 2863 CCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCC
 2917 AGCCGGCGTCCCGGAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGGCGCGG
 2971 TGGATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTGGTCGGTCATTTCGA
 3025 ACCCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCG
 3079 CTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTACGCCCATTC
 2504 GlnSerAspProAlaAlaAlaGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGlu
 3133 GCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCG
 2324 GlyGlyLeuGluGluAlaAlaAspArgThrAlaLeuAlaAlaAspGlnTyrArg
 3187 GTCCGCCACCCAGCCGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTC
 2144 AspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySerPheArgGlyAsnGlu
 3241 CACCATGATATTCGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCC
 1964 ValMetIleAsnProLeuCysAlaAspGlyHisThrValValLeuAspGluGly
 3295 GTCGGCATGCTCGCTTGAGCTGGCGAACAGTTCCGGTGGCGGAGCCCTG
 1784 AspProMetSerAlaLysLeuArgAlaPheLeuGluAlaProAlaLeuGlyGln
 3349 ATGCTCTTGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCATCCGAGTACGTGCTCG
 1604 HisGluGlnAspAspGlnAspValLeuGlyAlaGluMetArgThrArgAlaArg
 3403 CTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCAATGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGT
 1424 GluIleArgHisLysAlaGlnHisAspPheProCysThrAlaProAspLeuThr
 3457 ATGCAGCCGCCGATTGTCATCAGCCATGATGGATACTTTCGCGCAGGAGCAAG
 1244 HisLeuArgArgMetAlaAspAlaMetIleSerValLysGluAlaProAlaLeu
 3511 GTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCACCTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCT
 1064 HisSerSerLeuLeuAspGlnGlyProValGluGlyLeuLeuLeuTrpAspArg
 3565 TCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGC
 884 GlyAlaGluThrValValAspLeuValAlaAlaCysProValGlyThrThrAla
 3619 CAGCCACGATAGCCCGCTGCCCTCGTCTTGACGTTCAATCAGGGCACCGGACAG
 704 LeuTrpSerLeuArgAlaAlaGluAspGlnLeuGluAsnLeuAlaGlySerLeu
 3673 GTCGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGC
 524 AspThrLysValPheLeuValProArgGlyGlnAlaSerLeuArgPheValAla
 3727 GGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTC
 344 AlaAspSerCysGlyIleThrGlnGlnAlaTrpAspTyrGlyPheLeuArgGlu
 3781 CACCAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTGTTCATCATGCGAAA
 164 ValTrpAlaAlaProSerGlyAlaHisLeuGlyAspGlnGluIleMet
 3835 CGATCTCATCTGTCTCTTGATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAA

Fig. 2 (Forts.3)

11/18

BseRI BseRI
 3889 AGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGAGCGGCCTCGGCCT
 CTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACCTGG
 SV40 ori & Promotor
 3997 GCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGACTATGGTTGCTGACT
 NsiI
 4051 AATTGAGATGCATGCTTTCATACCTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTC
 SexAI NsiI
 4105 CACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTCATACCTTCTGCCTGCTG
 PvuII
 4159 GGGAGCCTGGGGACTTCCACACCCTAACTGACACACATCCACAGCTGGTTCT
 Bsu36I
 4213 TTCCGCCTCAGGACTCTTCTTTTCAATAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
 4267 AAACCTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGA
 2874...TrpHisLysIleLeuSerAlaGlyIleGluAlaIle
 Eam1105I
 4321 TCTGTCTATTTCTGTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA
 2744eGlnArgAsnArgGluAspMetThrAlaGlnSerGlyThrThrTyrIleValVa
 4375 CGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACGCGAGACC
 2564IleArgSerProLysGlyAspProGlyLeuAlaAlaIleIleGlyArgSerGly
 4429 CACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCG
 2384ArgGluGlyAlaGlySerLysAspAlaIlePheTrpGlyAlaProLeuAlaSe
 4483 AGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT
 2204rArgLeuLeuProGlyAlaValLysAspAlaGluMetTrpAspIleLeuGlnGly
 FspI Psp1406I
 4537 GCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACACGTTGTTG
 2024nArgSerAlaLeuThrLeuLeuGluGlyThrLeuLeuLysArgLeuThrThrAla
 4591 CCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGTTTCATTCA
 1844aMetAlaValProMetThrThrAspArgGluAspAsnProIleAlaGluAsnLe
 4645 GCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAA
 1664uGluProGluTrpArgAspLeuArgThrValHisAspGlyMetAsnHisLeuPh
 PvuI
 4699 AAGCGGTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAG
 1484eAlaThrLeuGluLysProGlyGlyIleThrThrLeuLeuLeuAsnAlaAlaTh
 4753 TGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCAT
 1304rAsnAspSerMetThrIleAlaAlaSerCysLeuGluArgValThrMetGlyAs
 bla Scal
 4807 CCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAGAAT
 1124pThrLeuHisLysGluThrValProSerTyrGluValLeuAspAsnGlnSerTy
 4861 AGTGATGCGGCGACGAGTTGCTCTTCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCG
 944rHisIleArgArgGlyLeuGlnGluGlnGlyAlaAspIleArgSerLeuValAla
 Psp1406I
 4915 CGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGC
 764aGlyCysLeuLeuValLysPheThrSerMetMetProPheArgGluGluProAla
 4969 GAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCACTC
 584gPheSerGluLeuIleLysGlySerAsnLeuAspLeuGluIleTyrGlyValArg
 ApaLI
 5023 GTGCACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAAGCGTTTCTGGGTGAG
 404gAlaGlyLeuGluAspGluAlaAspLysValLysValLeuThrGluProHisAla
 5077 CAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAT
 224aPheValProLeuCysPheAlaAlaPhePheProIleLeuAlaValArgPheHis
 SspI
 5131 GTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTT
 44sGlnIleSerMet
 BspHI
 5185 ATTGTCTCATGACGGGATACATATTTGAATGTATTAGAAAAATAAACAAATAG

Fig. 2 (Forts. 4)

12/18

5239 GGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGGG

5293 CATTAAAGCGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA

5347 GCGCCCTAGCGCCCGTCCCTTTCGGTTTCTTCCCTTCTCGCCACGTTCG

5401 CCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGTCCCTTTAGGGTTCCGATTTA

5455 GTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA

5509 GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGT

5563 TCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGG

5617 TCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAA

5671 ATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTA

5725 CAATTAC

Stem loop A

f1 IR Stem loop B

Dralll

Stem loop C Primer-RNA Start Transcription VS-Synthese

Nicking site Stem loop D Stem loop E

SspI

Fig. 2 (Forts. 5)

13/18

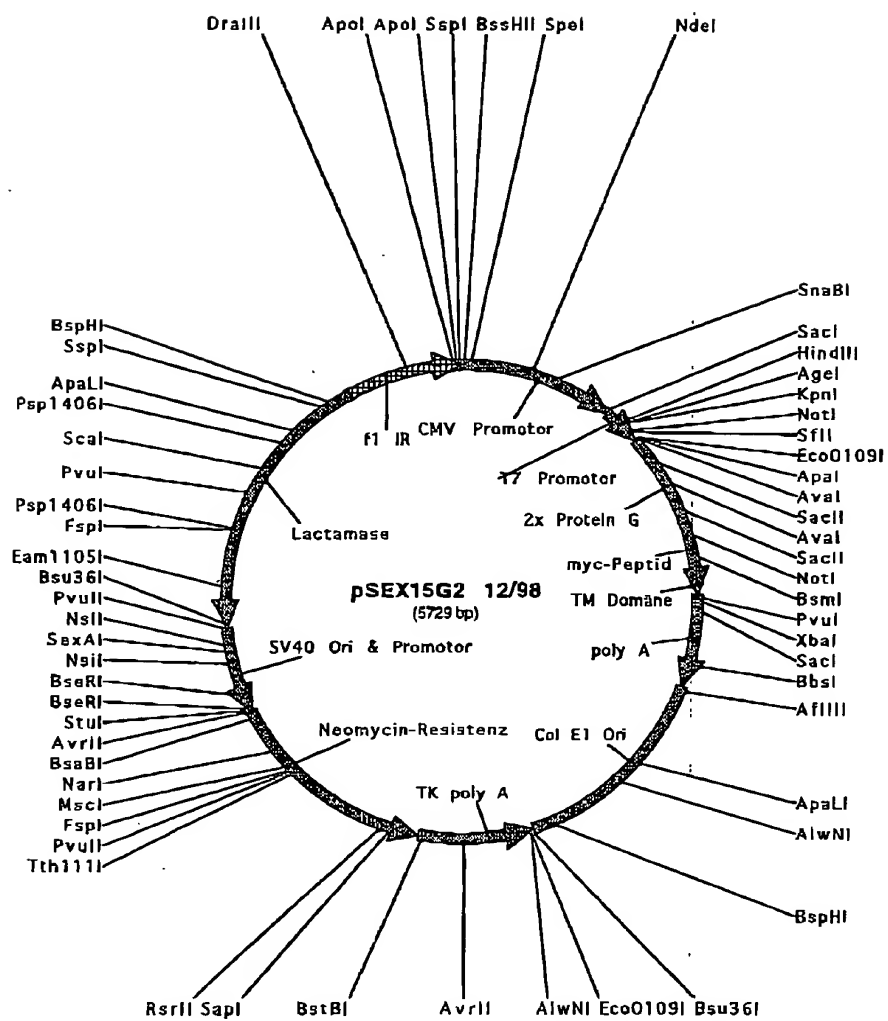


Fig. 3

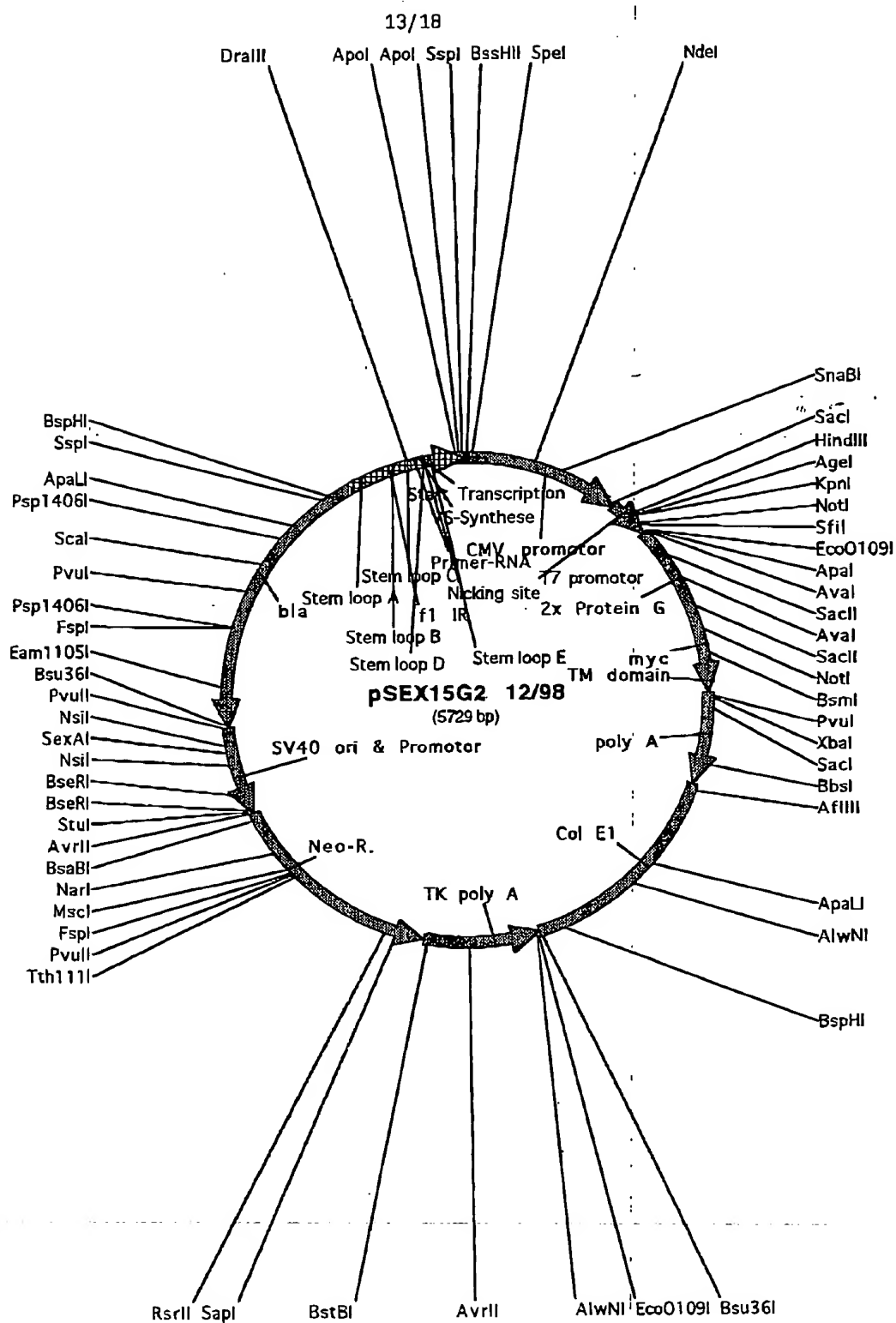


Fig. 3

14/18

BssHII SpeI
 1 GCGCGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
 57 TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATACTTACGGTAAATGGCCC
 113 GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTT
 169 CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGG
 NdeI
 225 TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAT
 CMV promotor
 281 TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTAT
 SnaBI
 337 GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG
 393 ATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGGGGATT
 449 TCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACAAAATCAAC
 505 GGGACTTTCAAAATGTCGTAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGGTAGG
 SacI
 561 CGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAAGCCAC
 T7 promotor HindIII KpnI
 617 TGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCCAAGCTTGGT
 SfiI
 AgeI NotI
 673 ACCGGTGGCATGGCACCCTGCATGCTGCTCTGCTGTGGCGGCCGCCCTGGCCCC
 1 MetAlaProCysMetLeuLeuLeuLeuAlaAlaAlaLeuAlaPr
 Apal EcoO109I Aval
 729 GACTCAGACCCGCGCGGGGCCCCAAAAGCCCGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCTGA
 16 Thr Gl nThr ArgAla Gl yAla Gl nLysPro Gl uVal l l eAspAlaSer Gl uLeuT
 785 CCCCCGCGTGACCACTACAAGCTAGTGATCAACGGCAAGACCCCTGAAGGGCGAG
 35 hrProAlaVal Thr Thr TyrLysLeuVal l l eAsnGlyLysThrLeuLysGlyGlu
 SacII
 841 ACCACCACCGAGGCCGTGGACGCCGCCACCGCGGAGAAGGTGTTCAACAATACGC
 54 Thr Thr Thr Gl uAlaValAspAlaAlaThrAlaGl uLysVal PheLysGlnTyrAl
 897 TAATGACAACGGGTCGACGGCGAGTGGACTTACGACGACGCCCAAGACCTTCA
 72 aAsnAspAsnGlyValAspGlyGluTrpThrTyrAspAspAlaThrLysThrPheT
 Aval
 2x Protein G
 953 CCGTGACCGAGAAGCCCGAGGTGATCGATGCCAGCGAGCTGACCCCGCCGTGACC
 91 hrVal Thr Gl uLysPro Gl uVal l l eAspAlaSer Gl uLeuThrProAlaVal Thr
 1009 ACCTACAAGCTAGTGATCAACGGCAAGACCCCTGAAGGGCGAGACCACCGAGGC
 110 Thr TyrLysLeuVal l l eAsnGlyLysThrLeuLysGlyGluThr Thr Thr Gl uAl
 SacII
 1065 CGTGGACGCCGCCACCGCGGAGAAGGTGTTCAACAATACGCTAATGACAACGGGG
 128 aValAspAlaAlaThrAlaGl uLysVal PheLysGlnTyrAlaAsnAspAsnGlyV

Fig. 3 (Forts. 1)

15/18

NotI
 1121 TCGACGGCGAGTGGACTTACGACGACGCCACCAAGACCTTACCCGTGACCGAGGCG
 147► aIAspGlyGluTrpThrTyrAspAspAlaThrLysThrPheThrValThrGluAla

myc
 1177 GCCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGCGCTCGACGAACA
 166► AlaAlaGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnGlyAlaValAspGluGlu

BsmI
 1233 AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGCTGTGGCCAGGACACGCAGGAGGTCA
 184► nLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnAlaValGlyGlnAspThrGlnGluValI

1289 TCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCC
 203► IeValValProHisSerLeuProPheLysValValValIleSerAlaIleLeuAla

TM domain
 1345 CTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAA
 222► LeuValValLeuThrIleIleSerLeuIleIleLeuIleMetLeuTrpGlnLysLy

PvuI XbaI
 1401 GCCACGTTCTGTCGGCCGATCGAGAATCCATCTAGAGCTATTCTATAAGTGTACCTA
 240► sProArgSerSerAlaAspArgGluSerIle*** ←

SacI
 1457 AATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGT
 ←

poly A
 1513 TGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCC
 1569 TTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT

BbsI
 1625 CTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG
 1681 GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCACTGGCG

AflIII
 1737 GTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAA
 1793 AGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATA
 1849 GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTGGCGA
 1905 AACCCGACAGGACTATAAAGATACCGGCTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
 1961 CTCTCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGG
 2017 GAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTC

ApalI Col E1
 2073 GTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGC
 2129 CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCAC

AlwNI
 2185 TGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
 2241 GAGTTCCTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTAT
 2297 CTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCG
 2353 GCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACG
 2409 CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACCG

Fig. 3 (Forts. 2)

16/18

BspHI

2465 TCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGA
 2521 TCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATA

EcoO109I

Bsu36I AlwNI

2577 TATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCC

2633 TGGGCTTCACCCGAACTTGGGGGTGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGT

2689 ATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGA

TK poly A

2745 ACCCCGCGTTTATGAACAAACGACCCAACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTAT

2801 TGCCGTCATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCTTCCGTGTTTCAGTTAGCC

AvrII

2857 TCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGGGCTGGAGGATCATC

2913 CAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGCGGCGCGT

BstBI

2969 GGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTGGTCGGTCATTTCAAGC
 3025 CCAGAGTCCCGCTCAGAAAGAACTCGTCAAGAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCG

2634 ●●●PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaIleArgGlnSer

3081 AATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCAITCGCCGCCA
 2484 rAspProAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyGlyL

SapI

3137 AGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCAC
 2294 euGluGluAlaIleAspArgThrAlaLeuAlaIleAspGlnTyrArgAspAlaVal

3193 ACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTCCACCATGATAT

2114 GlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySerPheArgGlyAsnGluValMetIleAs

3249 TCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCACGACGAGATCCTCGCGTCGGGCATGCTC

1924 nProLeuCysAlaAspGlyHisThrValValLeuAspGluGlyAspProMetSerA

3305 GCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTGATCATC

1734 lAlLysLeuArgAlaPheLeuGluAlaProAlaLeuGlyGlnHisGluGlnAspAsp

3361 CTGATCGACAAGACCGGCTTCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCG

1554 GlnAspValLeuGlyAlaGluMetArgThrArgAlaArgGluIleArgHisLysAla

3417 CTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCGCATTGCA

1364 aGlnHisAspPheProCysThrAlaProAspLeuThrHisLeuArgArgMetAlaA

3473 TCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTG

1174 spAlaMetIleSerValLysGluAlaProAlaLeuHisSerSerLeuLeuAspGln

Tth111I

3529 CCCCAGCACTTCGCCCATAAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTGCA
 994 GlyProValGluGlyLeuLeuLeuTrpAspArgGlyAlaGluThrValValAspLe

Neo-R.

PvuIIFspI MscI

3585 GCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCG
 804 uValAlaAlaCysProValGlyThrThrAlaLeuTrpSerLeuArgAlaAlaGluA

NarI

3641 TCTTGAGTTCAATCAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAAGAACCGGGCG
 614 spGlnLeuGluAsnLeuAlaGlySerLeuAspThrLysValPheLeuValProArg

3697 CCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGCTGTGTG

434 GlyGlnAlaSerLeuArgPheValAlaAlaAspSerCysGlyIleThrGlnGlnAl

3753 CCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCGGAGAACCTGCGTGCAAT

244 aTrpAspTyrGlyPheLeuArgGluValTrpAlaAlaProSerGlyAlaHisLeuG

BsaBI

3809 CCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCTGTCTCTTGATCGATCTTTGC
 54 lAspGlnGluIleMet

StuI

AvrII BseRI

3865 AAAAGCCTAGGCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCC

Fig. 3 (Forts. 3)

17/18

BseRI
 3921 GACGAGCGCGCTCGGCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGG
 —————
 SV40 ori & Promotor
 3977 AGAATGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGCGGGA
 NsiI
 4033 CTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAG
 SexAI NsiI
 4089 CCTGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACT
 PvuII
 4145 TCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCACA
 Bsu36I
 4201 GCTGGTTCTTTCCGCCTCAGGACTCTTCCTTTTCAATAAATCAATCTAAAGTATA
 4257 TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC
 2874 •••TrpHisLysIleLeuSerAlaGlyIleGlu
 Eam1105I
 4313 AGCGATCTGTCTATTTCTGTTCCATCAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAA
 2764 AlaIleGlnArgAsnArgGluAspMetThrAlaGlnSerGlyThrThrTyrIleVal
 4369 CTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGGAGAC
 2574 ValIleArgSerProLysGlyAspProGlyLeuAlaAlaIleIleGlyArgSerG
 4425 CCACGCTCACCGGCTCCGATTATCAGCAATAAACCGCCAGCCGGAAGGGCCGA
 2384 IyArgGluGlyAlaGlySerLysAspAlaIlePheTrpGlyAlaProLeuAlaSer
 4481 GCGCAGAACTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
 2204 ArgLeuLeuProGlyAlaValLysAspAlaGluMetTrpAspIleLeuGlnGlnAr
 FspI Psp1406I
 4537 GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGCAACGTTGTTGCCATT
 2014 gSerAlaLeuThrLeuLeuGluGlyThrLeuLeuLysArgLeuThrThrAlaMetA
 4593 GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGG
 1824 IValIProMetThrThrAspArgGluAspAsnProIleAlaGluAsnLeuGluPro
 4649 TTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTA
 1644 GluTrpArgAspLeuArgThrValHisAspGlyMetAsnHisLeuPheAlaThrLe
 PvuI
 4705 GCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTC
 1454 uGluLysProGlyGlyIleThrThrLeuLeuLeuAsnAlaAlaThrAsnAspSerM
 bla
 4761 ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTT
 1264 etThrIleAlaAlaSerCysLeuGluArgValThrMetGlyAspThrLeuHisLys
 Scal
 4817 TTCTGTGACTGGTCACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGGAC
 1084 GluThrValProSerTyrGluValLeuAspAsnGlnSerTyrHisIleArgArgGlu
 4873 CGAGTTGCTCTTGCCCGGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACT
 894 yLeuGlnGluGlnGlyAlaAspIleArgSerLeuValAlaGlyCysLeuLeuValL
 Psp1406I
 4929 TAAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTT
 704 ysPheThrSerMetMetProPheArgGluGluProArgPheSerGluLeuIleLys
 ApaLI
 4985 ACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAG
 524 GlySerAsnLeuAspLeuGluIleTyrGlyValArgAlaGlyLeuGlnAspGluAl
 5041 CATCTTTTACTTTACCAAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCC
 334 aAspLysValLysValLeuThrGluProHisAlaPheValProLeuCysPheAlaA
 5097 GCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATCTCTCTTTT
 144 IAlaPhePheProIleLeuAlaValArgPheHisGlnIleSerMet
 SspI BspHI
 5153 TCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG
 5209 AATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGTTCCGCGCACTTTCECCGAAAAGTG
 5265 CCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGTGTGGTTACGCG

Fig. 3 (Forts. 4)

18/18

Stem loop A
5321 CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCC

5377 CTTCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTC

f1 IR Stem loop B
5433 CCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTA

Dralll Stem loop C Primer-RNA
5489 GGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGCGGTTTTTCGCCCTTTGA

Start Transcription
VS-Synthese Nicking site Stem loop D Stem loop E
5545 CGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTC

5601 AACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGGGCCTA

ApoI ApoI SspI
5657 TTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAATAT

5713 TAACGCTTACAATTTAC

Fig. 3 (Forts. 5)

09/889182

JC18 Rec'd PCT/PTO 10 JUL 2001

1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum

<120> Selektion von monoklonalen Antikörpern

<130> K 2779

<140> PCT/DE00/00079

<141> 2000-01-11

<150> DE 199 00 635.0-41

<151> 1999-01-11

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1.

<210> 1

<211> 5732

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (737) ... (1420)

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antikörper-Bindeprotein

<400> 1

```

gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag      60
ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataaacttac ggtaaatggc cgcctggct      120
gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc      180
caatagggac ttccattga cgtcaatggg tggactatct acggtaaaact gccacttgg      240
cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgtcccttat tgacgtcaat gacggtaaat      300
ggccgccttg gcattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttcctact tggcagtaca      360
tctacgtatt agtcacgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc      420
gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga      480
gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgcccac      540
tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg gggaggtcta tataagcaga gctctctggc      600
taactagaga acccactgct tactgggetta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga      660
cccaagcttg gtaccgagct cggatccact agtaacggcc gccagtggtg tgggaattcgg      720
cttggggata tccacc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg      769
          Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu
          1                    5                    10

ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act ggt gac tat cca tat gat gtt cca      817
Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro
          15                    20                    25

```

2

gat tat gct ggg gcc caa aag ccc gag gtg atc gat gcc agc gag ctg 865
Asp Tyr Ala Gly Ala Gln Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu
30 35 40

acc ccc gcc gtg acc acc tac aag cta gtg atc aac ggc aag acc ctg 913
Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu
45 50 55

aag ggc gag acc acc acc gag gcc gtg gac gcc gcc acc gcg gag aag 961
Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys
60 65 70 75

gtg ttc aaa caa tac gct aat gac aac ggg gtc gac ggc gag tgg act 1009
Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr
80 85 90

tac gac gac gcc acc aag acc ttc acc gtg acc gag aag ccc gag gtg 1057
Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val
95 100 105

atc gat gcc agc gag ctg acc ccc gcc gtg acc acc tac aag cta gtg 1105
Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val
110 115 120

atc aac ggc aag acc ctg aag ggc gag acc acc acc gag gcc gtg gac 1153
Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp
125 130 135

gcc gcc acc gtg gag aag gtg ttc aaa caa tac gct aat gac aac ggg 1201
Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly
140 145 150 155

gtc gac ggc gag tgg act tac gac gac gcc acc aag acc ttc acc gtg 1249
Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val
160 165 170

acc gag gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat 1297
Thr Glu Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
175 180 185

ggg gcc gtc gac gga caa aac gac acc agc caa acc agc agc ccc tca 1345
Gly Ala Val Asp Gly Gln Asn Asp Thr Ser Gln Thr Ser Ser Pro Ser
190 195 200

gca tcc agc aac ata agc gga ggc att ttc ctt ttc ttc gtg gcc aat 1393
Ala Ser Ser Asn Ile Ser Gly Gly Ile Phe Leu Phe Phe Val Ala Asn
205 210 215

gcc ata atc cac ctc ttc tgc ttc agt tgaggtgaca cgtctagagc 1440
Ala Ile Ile His Leu Phe Cys Phe Ser
220 225

tattctatag tctcacctaa atgctagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag 1500

ttgccagcca totgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac 1560

tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 1620

ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 1680

caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa ccagtggcgg 1740

taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc 1800

agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttctgtgc gtttttccat aggctccgcc 1860

cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 1920

3

tataaagata ccaggcggtt ccccttgga gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc	1980
tgccgcttac cggataacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg cttctccata	2040
gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	2100
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca	2160
acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	2220
cgaggatagt aggcgggtgt acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta	2280
gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	2340
gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc	2400
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	2460
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatctt ggtcatgaga ttatcaaaaa	2520
ggatcttcac ctgatacctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	2580
atgagtaacc tgaggctatg gcagggcctg ccgccccgac gttggctgcg agccctgggc	2640
cttcaccgga acttgggggg tgggggtggg aaaaggaaga aacgcggggc tattggcccc	2700
aatggggtct cgggtgggta tcgacagagt gccagccctg ggaccgaacc ccgcgtttat	2760
gaacaaacga cccaacaccg tgcgttttat tctgtctttt tattgcgctc atagcgcggg	2820
tctcttcggg tattgtctcc ttccgtgttt cagttagect cccctagggg tgggcgaaga	2880
actccagcat gagatccccg cgctggagga tcatccagcc ggctccccg aaaacgattc	2940
cgaagcccaa cctttcatag aaggcggcgg tggaaatcga atctcgtgat ggcagggttg	3000
gcgtcgtctg gtgggtcatt tcgaacccca gagtcccgt cagaagaact cgtcaagaag	3060
gcgatagaag gcgatgcgtc gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca cgaggaagcg	3120
gtcagcccat tcgccccaa gctcttcagc aatatcacgg gtagccaacg ctatgtcctg	3180
atagcgggtcc gccacaccca gccggccaca gtcgatgaat ccagaaaagc ggccattttc	3240
caccatgata ttgggcaagc aggcacgccc atgggtcacg acgagatcct cgcgctcggg	3300
catgctcgcc ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcgcg agccctgat gctcttgatc	3360
atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc	3420
ttggtggctg aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgccgca ttgcatcagc	3480
catgatggat actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac	3540
ttcgccaat agcagccagt ccttcccgcc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca	3600
aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc tcgtcttgca gttcattcag	3660
ggcaccggac aggtcgggtc tgacaataaag aaccggggcg cctcgcgctg acagccggaa	3720
cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc	3780
cacccaagcg gccggagaa ctcgctgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc	3840
tcatcctgtc tcttgatcga tctttgcaaa agcctagggc tcaaaaaag cctcctcact	3900
acttctggaa tagctcagag gccgaggagg cggcctcggc ctctgcataa ataaaaaaa	3960

4

ttagtcagcc atggggcgga gaatgggcgg aactgggcgg agttaggggc gggatgggcg 4020
gagttagggg cgggactatg gttgctgact aattgagatg catgctttgc atacttctgc 4080
ctgctgggga gcttggggac tttccacacc tgggtgctga ctaattgaga tgcattgctt 4140
gcatacttct gcttgcctggg gagcctgggg actttccaca ccctaactga cacacattcc 4200
acagctggtt ctttccgcct caggactctt cctttttcaa taaatcaatc taaagtatat 4260
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 4320
tctgtctatt tcttcatcc atagtgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac 4380
gggagggctt accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg 4440
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg 4500
caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgcg ggaagctaga gtaagtgtt 4560
cgccagttaa tagtttgcg aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgt 4620
cgtcgtttgg tatgggttca ttcagctccg gtccccaacg atcaaggcga gttacatgat 4680
cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta 4740
agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca 4800
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 4860
agtgtatgcg gcgaccgagt tgcctcttgc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 4920
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 4980
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tctgtcacc aactgatctt 5040
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 5100
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 5160
attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 5220
agaaaaataa acaaataggg gtccgcgca catttcccg aaaagtgcc cctgacgcgc 5280
cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac 5340
ttgccagcgc cctagcgcgc gctcctttcg cttttttccc ttcctttctc gccacgttcg 5400
ccggttttcc ccgtcaagct ctaaatcggg ggtccctttt agggttccga tttagtgtt 5460
tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatg ttcacgtagt gggccatcgc 5520
cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 5580
tgttccaaac tggacaaca ctcaacccta tctcgggtcta ttcttttgat ttataagggg 5640
ttttgccgat ttggcctat tggtaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa ttaacgcga 5700
attttaacaa aatattaacg cttacaattt ac 5732

<210> 2,
<211> 228
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

5

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antikörper-Bindeprotein

<400> 2

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ala
 20 25 30
 Gln Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr
 35 40 45
 Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr
 50 55 60
 Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr
 65 70 75 80
 Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr
 85 90 95
 Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu
 100 105 110
 Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr
 115 120 125
 Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu
 130 135 140
 Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp
 145 150 155 160
 Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Ala Ala Ala
 165 170 175
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Val Asp Gly
 180 185 190
 Gln Asn Asp Thr Ser Gln Thr Ser Ser Pro Ser Ala Ser Ser Asn Ile
 195 200 205
 Ser Gly Gly Ile Phe Leu Phe Phe Val Ala Asn Ala Ile Ile His Leu
 210 215 220
 Phe Cys Phe Ser
 225

<210> 3

<211> 6094

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (682) ... (1782)

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antikörper-Bindeprotein

<400> 3

gcgcgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag
 60

6

ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaattggc ccgcctgget	120
gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtaggttccc atagtaacgc	180
caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggactatgt acggtaaact gccacttgg	240
cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgcacctat tgacgtcaat gacggtaaatt	300
ggccccgcctg gcattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttctact tggcagtaca	360
tctacgtatt agtcacgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtag atcaatgggc	420
gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga	480
gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat	540
tgacgcacaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctctctggc	600
taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga	660
cccaagcttg gtaccgggtgc g atg gca ccc tgc atg ctg ctc ctg ctg ttg	711
Met Ala Pro Cys Met Leu Leu Leu Leu Leu	
1 5 10	
gcg gcc gcc ctg gcc ccg act cag acc cgc gcg ggg gcc caa aag gag	759
Ala Ala Ala Leu Ala Pro Thr Gln Thr Arg Ala Gly Ala Gln Lys Glu	
15 20 25	
aag acc ccc gag gag ccc aag gag gag gtg acc atc aag gcc aac ctg	807
Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu	
30 35 40	
atc tac gcc gac ggc aag acc cag acc gcc gag ttc aag ggc acc ttc	855
Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe	
45 50 55	
gag gag gcc acc gcg gag gcc tac cgc tac gcc gac gcc ctg aag aag	903
Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys	
60 65 70	
gac aac ggc gag tac acc gtg gac gtg gcc gac aag ggc tac acc ctg	951
Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu	
75 80 85 90	
aac atc aag ttc gcc ggc aag gag aag acc ccc gag gag ccc aag gag	999
Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu	
95 100 105	
gag gtg acc atc aag gcc aac ctg atc tac gcc gac ggc aag acc cag	1047
Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln	
110 115 120	
acc gcc gag ttc aag ggc acc ttc gag gag gcc acc gcg gag gcc tac	1095
Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr	
125 130 135	
cgc tac gcc gac gcc ctg aag aag gac aac ggc gag tac acc gtg gac	1143
Arg Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp	
140 145 150	
gtg gcc gac aag ggc tac acc ctg aac atc aag ttc gcc ggc aag gag	1191
Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu	
155 160 165 170	

7

aag acc ccc gag gag ccc aag gag gag gtg acc atc aag gcc aac ctg 1239
Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu 185
175 180

atc tac gcc gac ggc aag acc cag acc gcc gag ttc aag ggc acc ttc 1287
Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe 200
190 195

gag gag gcc acc gcg gag gcc tac cgc tac gcc gac gcc ctg aag aag 1335
Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys 215
205 210

gac aac ggc gag tac acc gtg gac gtg gcc gac aag ggc tac acc ctg 1383
Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu 230
220 225

aac atc aag ttc gcc ggc aag gag aag acc ccc gag gag ccc aag gag 1431
Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu 250
235 240 245

gag gtg acc atc aag gcc aac ctg atc tac gcc gac ggc aag acc cag 1479
Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln 265
255 260

acc gcc gag ttc aag ggc acc ttc gag gag gcc acc gcg gag gcc tac 1527
Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr 280
270 275

cgc tac gcc gac gcc ctg aag aag gac aac ggc gag tac acc gtg gac 1575
Arg Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp 295
285 290

gtg gcc gac aag ggc tac acc ctg aac atc aag ttc gcc ggc gcg gcc 1623
Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Ala Ala 310
300 305

gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat ggg gcc gtc gac 1671
Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Val Asp 330
315 320 325

gga caa aac gac acc agc caa acc agc agc ccc tca gca tcc agc aac 1719
Gly Gln Asn Asp Thr Ser Gln Thr Ser Pro Ser Ala Ser Ser Asn 345
335 340

ata agc gga ggc att ttc ctt ttc ttc gtg gcc aat gcc ata atc cac 1767
Ile Ser Gly Gly Ile Phe Leu Phe Phe Val Ala Asn Ala Ile Ile His 360
350 355

ctc ttc tgc ttc agt tgagggtgaca cgtctagagc tattctatag tgtaacctaa 1822
Leu Phe Cys Phe Ser 365

atgctagagc tgcgtgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt 1882

gcccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aagggtccac tccactgtc ctttctaat 1942

aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtagggtgca ttctattctg gggggtggg 2002

tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg 2062

tgggctctat ggcctctgag gcggaagaa ccagtggcgg taatacgggt atccacagaa 2122

tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 2182

aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 2242

aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac cegacaggac tataaagata ccaggcggtt 2302

8

ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttecgaccc tgcggttac cggatacctg 2362
tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 2422
agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggetgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 2482
gaccgctcgc ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta 2542
tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatgt aggcgggtgct 2602
acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc 2662
tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gttagctcttg atccggcaaa 2722
caaaccaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 2782
aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 2842
aactcacgtt aagggaatctt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 2902
ttaaattaaa atgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaacc tgaggctatg 2962
gcaggggcctg ccgccccgac gttggctcgc agccctgggc cttcacccga acttgggggg 3022
tgggggtggg aaaaggaaga aacgcgggcg tatttgcccc aatgggggtct cgggtgggta 3082
tcgacagagt gccagccctg ggaccgaacc ccgcgtttat gaacaaacga cccaacaccg 3142
tgcgttttat tctgtctttt tattgccgtc atagcggggg ttccttcggg tattgtctcc 3202
ttcgtgtttt cagttagcct ccccttaggg tgggcgaaga actccagcat gagatccccg 3262
cgctggagga tcatccagcc ggcgctccgg aaaacgattc cgaagccaa cctttcatag 3322
aaggcggcgg tggaaatcgaa atctcgtgat ggcaggttgg gcgtcgcttg gtcggtcatt 3382
tcgaacccca gagtcccgct cagaagaact cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgt 3442
gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgccaa 3502
gctcttcagc aatatacagg gtagccaacg ctatgtctcg atagcgggtc gccacaccca 3562
gccggccaca gtgatgaat ccagaaaagc ggccattttc caccatgata ttcggcaagc 3622
aggcatcgcc atgggtcacg acgagatcct ccgcgtcggg catgctcgcc ttgagcctgg 3682
cgaacagttc ggttggcgcg agccctgat gctcttgatc atcctgatcg acaagaccgg 3742
cttccatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg aatgggcagg 3802
tagccggatc aagcgtatgc agccgcgcga ttgcatacgc catgatggat actttctcgg 3862
caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttcgccaat agcagccagt 3922
cccttcctgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca 3982
gccacgatag ccgcgtgccc tegtcttgca gttcattcag ggcaccggac aggtcgggtc 4042
tgacaaaaag aaccgggcgc cctgcgctg acagccggaa cccggcggca tcagagcagc 4102
cgattgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc caccgaagcg gccggagaac 4162
ctgcgtgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcatctgtc tcttgatcga 4222
tctctgcaaa agcctaggcc tccaaaaaag cctcctcact acttctggaa tagctcagag 4282
gccgaggagg cggcctcggc ctctgcataa ataaaaaaa ttagtcagcc atggggcgga 4342

9

gaatgggcgg aactgggcgg agttaggggc gggatgggcg gagttagggg cgggactatg 4402
gttgetgact aattgagatg catgctttgc atacttctgc ctgctgggga gcctggggac 4462
ttccacacc tgggttgctga ctaattgaga tgcattgctt gcatacttct gcctgctggg 4522
gagcctgggg actttccaca ccctaactga cacacattcc acagctgggt ctttccgcct 4582
caggactcct cctttttcaa taaatcaatc taaagtatat atgagttaa ac ttggtctgac 4642
agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tctgtctatcc 4702
atagtggcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc 4762
cccagtgtg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 4822
aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtgggtcctg caactttatc cgcctccatc 4882
cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg 4942
aacgttggtt ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 5002
ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa 5062
ggggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca 5122
ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt 5182
tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtea tcttgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 5242
tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 5302
ctcatcattg gaaaacgttc tccggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 5362
tccagttcga tgtaaccac tegtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 5422
agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg 5482
acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 5542
ggttactgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 5602
gttcgcgcga cttttcccg aaaagtcca cctgacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc 5662
gcggcgggtg tgggtgttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc 5722
gctcctttcg cttctctccc ttctcttctc gccacgttcg ccggttttc cgtcaagct 5782
ctaaatcggg ggtccctttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa 5842
aaacttgatt aggtgtatg ttcaegtatg gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc 5902
cctttgacgt tggagtcac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca 5962
ctcaacccta tctcgggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat 6022
tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg 6082
cttacaattt ac 6094

<210> 4
<211> 3167
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

10

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antikörper-Bindeprotein

<400> 4

```

Met Ala Pro Cys Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro
 1              5              10              15

Thr Gln Thr Arg Ala Gly Ala Gln Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro
      20              25              30

Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys
      35              40              45

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu
      50              55              60

Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr
      65              70              75              80

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
      85              90              95

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
      100             105             110

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
      115             120             125

Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
      130             135             140

Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
      145             150             155             160

Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro
      165             170             175

Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys
      180             185             190

Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu
      195             200             205

Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr
      210             215             220

Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
      225             230             235             240

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
      245             250             255

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
      260             265             270

Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
      275             280             285

Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
      290             295             300

Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile
      305             310             315             320

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Val Asp Gly Gln Asn Asp Thr Ser
      325             330             335

```


12

acc gtg acc gag aag ccc gag gtg atc gat gcc agc gag ctg acc ccc Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro 95 100 105	999
gcc gtg acc acc tac aag cta gtg atc aac ggc aag acc ctg aag ggc Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly 110 115 120	1047
gag acc acc acc gag gcc gtg gac gcc gcc acc gcg gag aag gtg ttc Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe 125 130 135	1095
aaa caa tac gct aat gac aac ggg gtc gac ggc gag tgg act tac gac Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp 140 145 150	1143
gac gcc acc aag acc ttc acc gtg acc gag gcg gcc gca gaa caa aaa Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Ala Ala Glu Gln Lys 155 160 165 170	1191
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat ggg gcc gtc gac gaa caa aaa ctc Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Val Asp Glu Gln Lys Leu 175 180 185	1239
atc tca gaa gag gat ctg aat gct gtg ggc cag gac acg cag gag gtc Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val 190 195 200	1287
atc gtg gtg cca cac tcc ttg ccc ttt aag gtg gtg gtg atc tca gcc Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Lys Val Val Val Ile Ser Ala 205 210 215	1335
atc ctg gcc ctg gtg gtg ctc acc atc atc tcc ctt atc atc ctc atc Ile Leu Ala Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Leu Ile 220 225 230	1383
atg ctt tgg cag aag aag cca cgt tgc tgc gcc gat cga gaa tcc atc Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro Arg Ser Ser Ala Asp Arg Glu Ser Ile 235 240 245 250	1431
tagagctatt ctatagtgtc acctaaatgc tagagctcgc tgatcagcct cgactgtgcc	1491
ttctagtgtc cagccatctg ttgtttgcc ctccecggtg ccttcttga ccttggaagg	1551
tgcactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcacgcatt gtctgagtag	1611
gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga	1671
caatagcagg catgctgggg atgcgggtggg ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag	1731
tggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa	1791
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgctt ttccataggc	1851
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtgg cgaaaccga	1911
caggactata aagataaccag gcgtttcccc ctggaagetc cctcgtgcgc tctcctgttc	1971
cgaccctgcc gcttacggga tacctgtccg cctttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt	2031
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct	2091
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg	2151
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta	2211
gcagagcgag gcatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct	2271

13

acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa	2331
gagttggttag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtggg ttttttggtt	2391
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atctttctta	2451
cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cagcttaagg gattttgggc atgagattat	2511
caaaaaggat ctccacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa	2571
gtatatatga gtaacctgag gctatggcag ggccctgccg cccgacgttg gctgcgagcc	2631
ctgggccttc acccgaactt ggggggtggg gtggggaaaa ggaagaaacg cgggcgtatt	2691
ggccccaatg gggctcgggt ggggtatcga cagagtgcga gccctgggac cgaacccgc	2751
gtttatgaac aaacgaccca acaccgtgcg ttttattctg tttttttatt gccgtcatag	2811
cgcgggttcc ttccggtatt gtctccttcc gtgtttcagt tagcctcccc ctagggtggg	2871
cgaagaactc cagcatgaga tccccgcgt ggaggatcat ccagccggcg tcccggaaaa	2931
cgattccgaa gcccaacctt tcatagaagg cggcgggtgga atcgaaatct cgtgatggca	2991
ggttgggcgt cgcttggtcg gtcatttcca accccagagt cccgctcaga agaactcgtc	3051
aagaaggcga tagaaggcga tgcgctgcga atcgggagcg gcgataccgt aaagcacgag	3111
gaagcggtea gccattcgc cgccaagctc ttcagcaata tcacgggtag ccaacgtat	3171
gtcctgatag cggtecgcca caccagccg gccacagtcg atgaatccag aaaagcggcc	3231
attttccacc atgatattcg gcaagcagge atcgccatgg gtcacgacga gatcctcgcc	3291
gtcgggcattg ctgccttga gcctggcgaa cagttcgggt ggcgcgagcc cctgatgctc	3351
ttgatcatcc tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta cgtgctcgct cgatgcgatg	3411
tttcgcttgg tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc gccgcattgc	3471
atcagccatg atggatactt tctcggcagg agcaagggtga gatgacagga gatcctgccc	3531
cggcacttcg cccaatagca gccagtcctt tcccgttcca gtgacaacgt cgagcacagc	3591
tgcgcaagga acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt cttgcagttc	3651
attcagggca cgggacaggt cggctttgac aaaaagaacc gggcgccctt gcgctgacag	3711
ccggaacacg gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt gccagtcac agccgaatag	3771
cctctccacc caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa tcatgcgaaa	3831
cgatcctcat cctgtctctt gatcgatctt tgcaaaagcc taggcctcca aaaaagcctc	3891
ctcactactt ctggaatage tcagaggccg aggaggcggc ctcggcctct gcataaataa	3951
aaaaaatag tagccatgg ggcgagaaat gggcggaact gggcgagtt agggcgggga	4011
tgggcggagt tagggcggg actatggttg ctgactaatt gagatgcatt ctttgcatac	4071
ttctgcctgc tggggagcct ggggacttcc cacacctggg tgctgactaa ttgagatgca	4131
tgctttgcat acttctgctt gctggggagc ctggggactt tccacacct aactgacaca	4191
cattccacag ctgggtcttt ccgcctcagg actcttctt tttcaataaa tcaatctaaa	4251
gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct	4311

14

cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgectgact ccccgctctg tagataacta 4371
 cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgga gacccacgct 4431
 caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag cgcagaagtg 4491
 gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa 4551
 gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt 4611
 cagcgtctgc gtttggtatg gcttcattca gctccgggtc ccaacgatca aggcgagtta 4671
 catgatcccc catgttggtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgta 4731
 gaagtaagtt ggcgcgagtg ttatcactca tggttatgga agcactgcat aattctctta 4791
 ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttcttg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct 4851
 gagaatagtg tatcgccgga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataatacgg 4911
 cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgtttcttg gggcgaaaaac 4971
 tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact 5031
 gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa 5091
 atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac ggaatatgtg aatactcata ctcttccttt 5151
 ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat 5211
 gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 5271
 acgcgccttg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 5331
 ctacacttgc cagcgcctta ggcgcgctc ctttcgcttt ctccctctcc tttctcgcca 5391
 cgttcgcggg ctttccccgt caagctctaa atcggggggt ccttttaggg ttccgattta 5451
 gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac ttgattaggg tgatgggttca cgtagtgggc 5511
 catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttga gtccacgttc tttaatagtg 5571
 gactcttggt ccaaaactga acaactca accctatctc ggtctattct ttgatttat 5631
 aagggtttt gctgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 5691
 acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttac 5729

<210> 6

<211> 250

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antikörper-Bindeprotein

<400> 6

Met Ala Pro Cys Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro
 1 5 10 15
 Thr Gln Thr Arg Ala Gly Ala Gln Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser
 20 25 30

15

Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys
35 40 45
Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala
50 55 60
Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu
65 70 75 80
Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro
85 90 95
Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys
100 105 110
Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala
115 120 125
Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp
130 135 140
Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe
145 150 155 160
Thr Val Thr Glu Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
165 170 175
Leu Asn Gly Ala Val Asp Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
180 185 190
Asn Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser
195 200 205
Leu Pro Phe Lys Val Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val
210 215 220
Leu Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys
225 230 235 240
Pro Arg Ser Ser Ala Asp Arg Glu Ser Ile
245 250

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE


An:		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Huber & Schübler Patentanwälte 26 APR. 2001 Frist: </div>		<div style="text-align: center;"> PCT MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS (Regel 71.1 PCT) </div>	
SCHÜBLER, Andrea, Truderinger Str. 246, D-81825, München ALLEMAGNE					
Absendedatum (Tag/Monat/Jahr)		25.04.2001			
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2779 - sch/msl		WICHTIGE MITTEILUNG			
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00079	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 11/01/1999			
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.					

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiernit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
4. **ERINNERUNG**
 Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

 Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

 Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde


 Europäisches Patentamt
 D-80298 München
 Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
 Fax: +49 89/2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Büchler, S

Tel. +49 89 2399-8090



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2779 - sch/msl	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00079	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 11/01/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/06		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 04/08/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 25.04.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523658 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wimmer, G Tel. Nr. +49 89 2399 7347 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00079

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der Bestandteile der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17):*
Beschreibung, Seiten:

1-16 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-20 mit Telefax vom 05/04/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/18-18/18 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll In der Beschreibung, Seiten:

1-15 (SEQ ID NOS. 1-6), in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**Internationales Aktenzeichen **PCT/DE00/00079**

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- | | |
|--|---------|
| <input type="checkbox"/> Beschreibung, | Seiten: |
| <input type="checkbox"/> Ansprüche, | Nr.: |
| <input type="checkbox"/> Zeichnungen, | Blatt: |

- 5.
- ☐
- Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	16-20
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	16-20
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-20
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00079

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Art. 35(2) PCT hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung.

- 1) Im Anschluß wird auf folgende Dokumente Bezug genommen (die Reihenfolge der Dokumente entspricht der Reihenfolge ihrer Auflistung im Internationalen Recherchenbericht):

D1: EP-A-0 028 902 (BIO RESPONSE INC) 20. Mai 1981 (1981-05-20)

D2: WO 90 00625 A (MONOCLONETICS INT ;WARRINGTON RICHARD E (US)) 25. Januar 1990 (1990-01-25)

Neuheit unter Art. 33(2) PCT.

- 2) Gegenstand des Anspruches 1 ist ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, wobei die Antikörper mittels eines Antikörper-Bindeproteins auf der Oberfläche der Hybridomzellen präsentiert werden, und wobei diese Bindeproteine über die Myelomzellen oder durch Expressionsvektoren in die Hybridomzellen eingebracht werden.

Dokumente D1 und D2 beschreiben die Fusion von Myeloma- und B-Zellen zur Produktion von Antikörpern, wobei erfindungsgemäße Antikörper-Bindeproteine nicht verwendet werden. Obwohl für die Hybridomzellen von D1 und D2 die Expression der natürlichen "Antikörper-Bindeproteine" CD16 und CD32 zu erwarten ist, werden diese in den Methoden von D1 und D2 weder über Expressionsvektoren, noch über die Myelomzellen eingebracht, sondern sind durch die natürliche Expression in B-Zellen vorhanden.

Somit kann der Gegenstand von Anspruch 1 als neu anerkannt werden.
Infolgedessen sind auch die abhängigen Ansprüche 2-14 als neu anzusehen.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00079

- 3) Ebenso sind solche Antikörper-Bindeproteine selbst, sowie dafür kodierende DNA im Stand der Technik nicht beschrieben. Anspruch 15 ist somit neu.
- 4) Jedoch ist der angestrebte Schutzbereich von Anspruch 16 nicht klar beschrieben. Das Merkmal "durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" läßt eine weite Interpretation zu, nachdem eine Beschränkung dieser Variation, z.B. entsprechend jener der Beschreibung, im Anspruch nicht enthalten ist. Das minimale Vorhandensein der in Anspruch 15 genannten Domänen stellt keine eindeutige Beschränkung dieser Variationen dar, da durch jegliche Variation innerhalb einer dieser Domänen das variante Protein nicht mehr unter Anspruch 15 fiel.
- 5) Entsprechendes gilt auch für Anspruch 17. Auch hier erlaubt die Formulierung "durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA", ohne weitere Beschränkung, keine genaue Bestimmung des angestrebten Schutzbereiches. Infolgedessen kann für Ansprüche 16 und 17 Neuheit nicht anerkannt werden.
- 6) Neuheit der Ansprüche 18-19 kann nur nach Wiederherstellung der Neuheit von Anspruch 17 anerkannt werden.
- 7) Wie in Abschnitt V.5 beschrieben, können die durch Anspruch 16 definierten Proteine nicht als neu anerkannt werden. Entsprechend können auch Antikörper gemäß Anspruch 20, welche gegen solche Proteine gerichtet sind, nicht als neu gelten.
Weiters ist zu bemerken, daß auch bei ausreichend klarer Definition der Proteine von Anspruch 16 die Neuheit der Antikörper gegen solche Proteine fraglich ist, da auch bekannte Antikörper gegen z.B. das Maus-Ig-Kappa - Signalpeptid mit einem Fusionsprotein, welches eine solche Kette beinhaltet, binden würden.

Erfinderische Tätigkeit unter Art. 33(3) PCT.

- 8) Herstellung von Antikörpern mittels Fusionierung von Myeloma- und B-Zellen ist im Stand der Technik ausgiebig beschrieben. Darüber hinaus wird in Dokument D2 eine Methode zur Präselektion Antikörper-produzierender B-Zellen durch Nutzung der Oberflächenpräsentation der Antikörper erwähnt.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00079

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem bestand somit in einer Modifikation der Oberflächenpräsentation, die darüber hinaus die Selektion gewünschter Antikörper produzierender Zellen nach der Fusionierung ermöglicht.

Während die Verwendung Antikörper-bindender Oberflächenproteine aus Dokument D2 abgeleitet werden könnte, ist jedoch auf kein spezifisches Protein für eine solche Anwendung hingewiesen. Insbesondere existiert im Stand der Technik kein Hinweis auf erfindungsgemäß konstruierte Proteine, welche durch Expression in Hybridomzellen deren spezifische Selektion erlauben.

Somit kann ein erfinderischer Schritt für Ansprüche 1-19 anerkannt werden, soweit das Kriterium der Neuheit für diese Ansprüche gilt bzw. wiederhergestellt werden kann.

1

K 2779

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels
5 eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene, wobei die Antikörper-Bindeproteine über die Myelomzellen in die Hybridomzellen oder über sie kodierende Expressionsvektoren in die Hybridomzellen eingefügt werden.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker umfaßt.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Fc-Bindeprotein oder Teile davon umfaßt.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus Fc-Bindeproteinen oder Teilen davon umfaßt.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Fc-Bindeprotein CD16, CD32 oder CD64 ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 - 5, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Antikörper-Bindungsdomäne der Proteine A, G, L oder LG umfaßt.
- 30 7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.

GEAENDERTES BLATT

Empfangszeit 5. Apr. 15:00

2

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Antikörper-Bindeprotein jenes von Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die Hybridomzellen Rag1 und/oder Rag2 (über)exprimieren.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, wobei die Antigene von einer Antigen-Bibliothek stammen.
- 10 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene an einen Träger gebunden sind.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Träger Magnetobeads umfaßt.
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene eine Fluoreszenz- oder Biotinmarkierung umfassen.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Fluoreszenzmarkierung FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin umfaßt.
- 20 15. Antikörper-Bindeprotein, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.
- 25 16. Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15, wobei das Antikörper-Bindeprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1, Fig. 2 bzw. Fig. 3 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.
- 30 17. DNA, kodierend für das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 16, umfassend:
 - 35 (a) die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Figuren 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten Code verwandte DNA.

- 5 18. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch 17.
19. Zellen, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 18.
20. Antikörper, gerichtet gegen das Antikörper-Bindeprotein
10 nach Anspruch 16.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

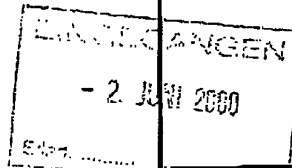
Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An
HUBER & SCHÜSSLER
Z.H. HUBER, Bernard
Truderinger Str. 246
D-81825 München

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)



29.7.2001

Absendeterminum
(Tag/Monat/Jahr) 29/05/2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

K 2779 - hu/ms

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00079

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr) 11/01/2000

Anmelder

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.95

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. Weiteres Vorgehen: Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von 18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90¹ bzw. 90²3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte:

Innerhalb von 20 Monaten seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nina Vercio

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu nummerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu nummerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 52.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2779 - hu/msl	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/00079	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/01/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 11/01/1999
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 33.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet

☒ keine der Abb.

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

 Internat. Aktenzeichen
 PCT/DE 00/00079

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/06 C12N5/20 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/79 C12N5/10 C07K16/18		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 028 902 A (BIO RESPONSE INC) 20. Mai 1981 (1981-05-20) Seite 5, Zeile 7 -Seite 6, Zeile 29 Seite 8, Zeile 10 -Seite 10, Zeile 13 Ansprüche	1-20
A	WO 90 00625 A (MONOCLONETICS INT ;WARRINGTON RICHARD E (US)) 25. Januar 1990 (1990-01-25) Seite 5, Zeile 6 -Seite 6, Zeile 2 Ansprüche	1-20
A	WO 97 08186 A (INVITROGEN CORP) 6. März 1997 (1997-03-06) Seite 13, Zeile 15 -Seite 14, Zeile 10 Seite 15, Zeile 9 -Seite 16, Zeile 10 Ansprüche 1,20,30	1-20
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
22. Mai 2000		29/05/2000
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Covone, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die in der Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/DE 00/00079

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0028902	A	20-05-1981	AU 538128 B 02-08-1984
			AU 6401280 A 07-05-1981
			CA 1149738 A 12-07-1983
			DE 3063363 D 07-07-1983
			JP 56085287 A 11-07-1981
			ZA 8006506 A 30-09-1981
WO 9000625	A	25-01-1990	KEINE
WO 9708186	A	06-03-1997	US 6017754 A 25-01-2000
			AU 713352 B 02-12-1999
			AU 7253196 A 19-03-1997
			CA 2202907 A 06-03-1997
			EP 0788508 A 13-08-1997